



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

ULB

Entwicklung promiskuitiver Aldolasen

Acke, Fabian
(2020)

DOI (TUprints): <https://doi.org/10.25534/tuprints-00011821>

Lizenz:



CC-BY-SA 4.0 International - Creative Commons, Namensnennung, Weitergabe unter gleichen Bedingungen

Publikationstyp: Dissertation

Fachbereich: 07 Fachbereich Chemie

Quelle des Originals: <https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/11821>

Entwicklung promiskuitiver Aldolasen



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie

der Technischen Universität Darmstadt vorgelegt von

Fabian Acke

geboren in Hamburg

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolf-Dieter Fessner

Zweitgutachter: Prof. Dr. Felix Hausch

Darmstadt 2020

Acke, Fabian: Entwicklung promiskuitiver Aldolasen
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2020
URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-118212
Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2020

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International
<https://creativecommons.org/licenses/>

Die vorliegende Dissertation wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Wolf-Dieter Fessner am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt im Zeitraum von Oktober 2014 bis April 2020 durchgeführt. Die praktischen Arbeiten im Labor wurden im August 2019 abgeschlossen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Aldolreaktionen.....	1
1.1.1	Enamin-/Iminium-Katalyse.....	3
1.1.2	Enzyme und katalytische Antikörper in Aldolreaktionen.....	3
1.1.3	Indirekte und direkte metall- und metalloidekatalysierte Aldolreaktionen.....	5
1.1.4	Zusammenfassung Aldolreaktionen.....	5
1.2	Aldolasen.....	6
1.2.1	Klassifizierung von Aldolasen.....	7
1.2.2	Glycin-abhängige Aldolasen.....	9
1.2.3	Pyruvat- und Phosphoenolpyruvat-abhängige Aldolasen.....	10
1.2.4	DHAP-abhängige Aldolasen.....	11
1.2.5	DHA-abhängige Aldolasen – D-Fructose-6-phosphat-Aldolase.....	12
1.2.6	Acetaldehyd-abhängige Aldolasen – D-Desoxyribose-5-phosphat-Aldolase.....	14
1.3	Desoxyzucker.....	17
1.4	Bidirektionale C–C-Bindungsknüpfung mit Enzymen an Dialdehyden („Tandem“-Aldolreaktionen).....	21
1.5	Stand der Forschung – D-Fructose-6-phosphat-Aldolase.....	22
1.5.1	Einsatz von FSA in der Synthese – Aldolakzeptoren.....	23
1.5.2	Einsatz von FSA in der Synthese – Aldoldonoren.....	31
1.6	Stand der Forschung – D-Desoxyribose-5-phosphat-Aldolase.....	34
2	Zielsetzung.....	39
3	Allgemeiner Teil – D-Fructose-6-phosphat-Aldolase.....	43
3.1	Synthesen von Hydroxyaldehyden.....	43
3.1.1	Synthese von 3-Hydroxyaldehyden – Grundlagen.....	43
3.1.2	Synthesen linearer Hydroxyaldehyde.....	44
3.1.3	Synthesen tertiär substituierter, offenkettiger und monozyklischer Hydroxyaldehyde.....	46
3.1.4	Synthesen polyzyklischer Hydroxyaldehyde.....	53
3.2	FSA-katalysierte Synthesen von Desoxyzuckern.....	63
3.2.1	Substratscreening mit FSA ^{wt} und FSA ^{A129S}	63
3.2.2	Aktivitätsscreening von FSA ^{wt} und FSA ^{A129S} bei höheren Temperaturen.....	68
3.2.3	Synthesen ausgehend von linearen 3-Hydroxyaldehyden.....	76
3.2.4	Synthesen ausgehend von tertiären 3-Hydroxyaldehyden.....	83

3.2.5	Synthesen ausgehend von linearen Dialdehyden und Intermediaten	86
3.2.6	Synthesen ausgehend von monozyklischen Bis-(3-hydroxyaldehyden).....	91
3.2.7	Synthesen ausgehend von polyzyklischen Mono- und Bis-(3-hydroxyaldehyden)	91
3.2.8	Tests zur Umsetzung linearer Dialdehyde mit Aceton durch FSA ^{D6H} und DERA ^{F200I}	95
3.3	Zusammenfassung und Ausblick – FSA.....	97
4	Allgemeiner Teil – D-Desoxyribose-5-phosphat-Aldolase.....	103
4.1	Synthese von Bernsteinsäuresemialdehyd.....	103
4.1.1	Synthese von BSA ausgehend von 4-Pentensäure	105
4.1.2	Synthese von BSA ausgehend von 1,5-Cyclooctadien	110
4.1.3	Synthese von BSA über 5-Hydroxyfuran-2(5H)-on	111
4.2	Synthese chiraler hydroxylierter C ₇ -Carbonsäuren	114
4.2.1	DERA ^{F200I} -katalysierte Umsetzung von BSA mit Aceton und Fluoraceton	115
4.2.2	Untersuchung des inhibitorischen Effekts von BSA auf FSA ^{A129S}	117
4.3	Synthese chiraler hydroxylierter C ₈ -Carbonsäurederivate	119
4.3.1	Derivatisierungsreaktionen	120
4.4	Zusammenfassung und Ausblick – DERA.....	125
5	Experimentalteil.....	129
5.1	Messgeräte und Messmethoden.....	129
5.1.1	Allgemeines.....	129
5.1.2	Lösungsmittel.....	129
5.1.3	Chromatographiemethoden	129
5.1.4	Gefriertrocknung	131
5.1.5	HR-ESI-Massenspektrometrie.....	131
5.1.6	NMR-Spektroskopie.....	131
5.1.7	Schmelzbereiche	132
5.1.8	UV/Vis-Spektren	132
5.1.9	Ozonolysen	132
5.2	Allgemeine Arbeitsmethoden.....	132
5.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV).....	134
5.4	Synthesevorschriften	136
5.4.1	Versuche zu Kapitel 3.1.2.....	136
5.4.2	Versuche zu Kapitel 3.1.3.....	140

5.4.3	Versuche zu Kapitel 3.1.4	154
5.4.4	Versuche zu Kapitel 3.2.1	169
5.4.5	Versuche zu Kapitel 3.2.2	172
5.4.6	Versuche zu Kapitel 3.2.3 bis 3.2.7	173
5.4.7	Versuche zu Kapitel 3.2.8	199
5.4.8	Versuche zu Kapitel 4.1	199
5.4.9	Versuche zu Kapitel 4.2	207
5.4.10	Versuche zu Kapitel 4.3	209
5.5	DERA-Sequenzen	214
6	Abkürzungsverzeichnis	217
7	Quellenverzeichnis	219
8	Spektrenanhang	227
	Danksagung	251
	Lebenslauf	253
	Erklärung gemäß Promotionsordnung	255

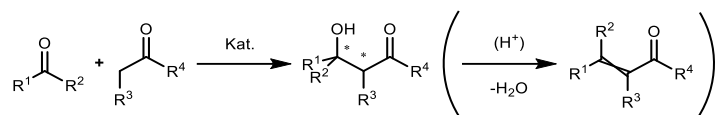
1 Einleitung

Die Herstellung und Gewährleistung eines stetigen Nachschubs an nutzbaren organischen Materialien ist eines der wichtigen Arbeitsgebiete von synthetisch arbeitenden Chemikern. Ein Großteil an Komponenten für Medikamente, Kosmetika, Polymere und Farbstoffe wird aus organischen Materialien bezogen. Die Knüpfung von C–C-Bindungen ist hier mitunter eine der wichtigsten Methoden, um Grundstrukturen solcher Materialien aufzubauen.^[1-2] Vom Standpunkt der grünen, nachhaltigen Chemie aus betrachtet ist die Entwicklung von effizienten, sicheren, energiesparenden und umweltschonenden Methoden erstrebenswert. Um die Nachhaltigkeit chemisch-katalytischer Verfahren hervorzuheben, sollten diese idealerweise unter milden Reaktionsbedingungen und unter Nutzung möglichst geringer Katalysatormengen ablaufen.

Biologisch aktive Moleküle sind meist komplexe Moleküle, die ein oder mehrere Stereozentren enthalten, welche in den allermeisten Fällen einen bedeutenden Einfluss auf die biologische Wirkung haben. Daher ist es in der Synthese von Medikamenten und anderen biologisch aktiven Verbindungen unabdingbar, Stereozentren hoch selektiv aufzubauen. Dies ist vor Allem deshalb wichtig, da Enantiomere oft unterschiedliche biologische Aktivitäten haben. In der chemischen Synthese gibt es verschiedene Möglichkeiten, um enantiomerenreine Substanzen herzustellen. Eine Möglichkeit ist die chromatographische oder kinetische Auftrennung von racemischen Produkten. Ein eindeutiger Nachteil dabei ist, dass nur die Hälfte an nutzbarem Material verwendet wird, wodurch ein Großteil des Ausgangsmaterials als Abfall anfällt oder einer Racemisierung unterworfen werden muss. Infolgedessen ist die direkte asymmetrische Synthese die attraktivste Alternative. *Chiral Pool*-Synthesen stellen eine zuverlässige Strategie dar, um chirale Zielmoleküle mit bekannter absoluter Stereokonfiguration zu erhalten. Umwandlungen werden bevorzugt durch eine diastereoselektive Synthese, ausgehend von enantiomerenreinen Naturstoffen wie D-Kohlenhydraten, L-Aminosäuren, Terpenen und Alkaloiden, erreicht.^[3] Der eingesetzte Naturstoff kann auch als stöchiometrisch gekoppeltes Auxiliar zur Steuerung eingesetzt und danach in der Regel wiedergewonnen werden. Die limitierte Verfügbarkeit von chiralen Naturstoffen schränkt diese Vorgehensweise jedoch ein. Eine vielversprechendere Strategie, um an chirale Moleküle zu gelangen, stellt die enantioselektive Synthese ausgehend von achiralen oder racemischen Ausgangsmaterialien unter Einsatz von enantiomerenreinen Reagenzien und Katalysatoren dar. Vorteile einer enantioselektiven Synthese sind einerseits, dass ein chirales Zentrum an der gewünschten Position zu einem ausgewählten Zeitpunkt in der Synthesesequenz eingebaut werden kann und andererseits, dass das Zielprodukt aus nicht-natürlichen achiralen oder racemischen Verbindungen hergestellt werden kann.^[3]

1.1 Aldolreaktionen

Bei der Aldolreaktion wird eine C–C-Bindung zwischen einer Carbonylverbindung und einer enolisierbaren Carbonylverbindung geknüpft, um β -Hydroxycarbonylverbindungen zu erhalten (Schema 1). Hierbei werden bis zu zwei neue stereogene Zentren gebildet, wobei folglich vier verschiedene Stereoisomere gebildet werden können.^[4-5] Die Reaktion kann dabei sowohl unter basischer als auch saurer Katalyse ablaufen. Auf die C–C-Bindungsknüpfung kann im Anschluss direkt eine Eliminierung von Wasser eintreten (dann Aldolkondensation genannt). Diese Dehydratisierung kann zwar bei bestimmten Substraten spontan auftreten, in den meisten Fällen erfolgt diese jedoch sauer katalysiert und wird sowohl durch die Ausbildung eines α,β -ungesättigten Systems in Konjugation zur C=O-Einheit, als auch durch elektronenziehende Substituenten an C $_{\alpha}$ (R³) begünstigt.



Schema 1. Aldolreaktion zwischen einer Carbonylverbindung und einer enolisierbaren Carbonylverbindung zur β -Hydroxycarbonylverbindung. In sauren Medien kann im Anschluss eine Aldolkondensation unter Eliminierung von Wasser eintreten.

Die asymmetrische Aldolreaktion ist ein Grundstein in der modernen chemischen Synthese, um stereoselektiv polyfunktionale organische Moleküle wie Kohlenhydrate, Aminosäuren und deren Analoga aufzubauen.^[4-5] Wenn Aldehyde oder unsymmetrische Ketone als Carbonylakzeptor eingesetzt werden, wird am β -Kohlenstoffatom der β -Hydroxycarbonylverbindung ein neues Stereozentrum eingeführt. Die absolute Konfiguration des neu gebildeten Stereozentrums lässt sich durch eine asymmetrische Synthese kontrollieren, wobei der ausschlaggebende Schritt der selektiven Bindungsknüpfung während der C–C-Knüpfung erfolgt. Folglich ist die asymmetrische Aldolreaktion eine der am intensivsten untersuchten Reaktionen zur stereokontrollierten Bildung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen (Abbildung 1).

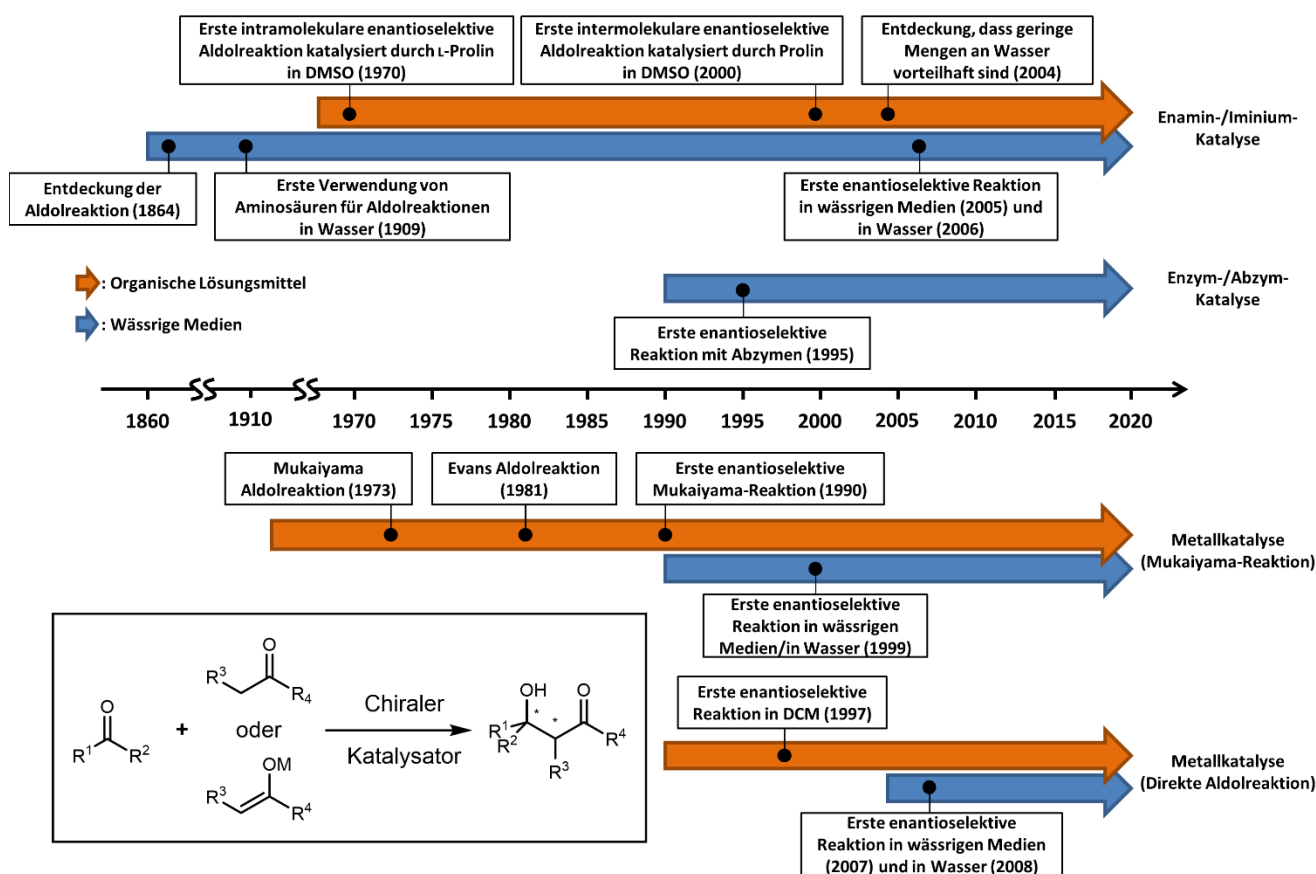
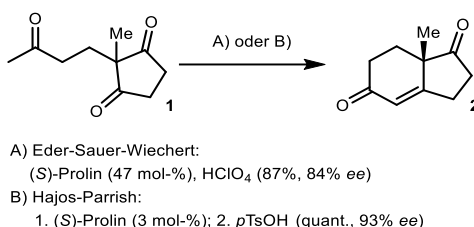


Abbildung 1. Historische Entwicklung von (asymmetrischen) Aldolreaktionen. Orange: Reaktionen in organischen Lösungsmitteln. Blau: Reaktionen in wässrigen Medien. Kasten (links, unten): Aldolreaktion katalysiert durch einen chiralen Katalysator zwischen einem Carbonyl-Akzeptor und entweder einer enolisierbaren Carbonylverbindung oder einem Enolat zur β -Hydroxycarbonylverbindung.^[3]

1.1.1 Enamin-/Iminium-Katalyse

Eines der frühesten Beispiele zur Synthese von enantiomerenreinen β -Hydroxycarbonylverbindungen ist die Verwendung von Substraten aus dem *Chiral Pool*. Als chirale Auxiliare finden beispielsweise Katalysatoren basierend auf Aminosäuren wie L-Prolin oder L-Phenylalanin oder Phenylethylamine wie (1*R*,2*S*)-Ephidrin oder (1*R*,2*S*)-Norephidrin Anwendung.^[6] Hierbei werden Aldoldonoren, die ein chirales Auxiliar tragen, in einer diastereoselektiven Reaktion umgesetzt, um optisch aktive Substrate herzustellen. Asymmetrische Aldoladditionen an Aldehyde mit chiralen Auxiliaren sind vielfältig bekannt und in der Regel sind dadurch alle Diastereomere selektiv zugänglich. Aldoladditionen an Ketone sind hingegen weniger gut bekannt und zudem weniger diastereoselektiv. Chirale Auxiliare sind in der Lage, einfache oder komplexe Substrate umzusetzen, sodass, je nach Wahl der Reaktionsbedingungen, alle vier möglichen Diastereomere erhalten werden können, was einer relativ großen Flexibilität entspricht.^[3,6] Die Stereoselektivität der Reaktion hängt gewöhnlich direkt von der enantiomeren Reinheit des Auxiliars ab. Bekannte Nachteile sind der Bedarf an stöchiometrischen Mengen und die zusätzlichen Schritte für den Einbau sowie die Abspaltung des Auxiliars. In einigen Fällen ist zur absoluten Kontrolle der Stereoselektivität zusätzlich der Einsatz von Additiven oder eine substanzielle Veränderung des Reagenzes nötig.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, auf Aminen basierende Organokatalysatoren einzusetzen. Diese bilden mit dem Aldoldonor eine Schiff'sche Base aus, welche sich zu einem Enamin umlagert, das wiederum als reaktives Nukleophil reagiert. Einer der ersten untersuchten Organokatalysatoren war Prolin, welches bereits in den 1970er Jahren in der enantioselektiven intramolekularen Hajos-Parrish-Eder-Sauer-Wiechert-Reaktion Anwendung fand (Schema 2).^[7-8]



Schema 2. Eder-Sauer-Wiechert- (A) und Hajos-Parrish-Reaktion (B) ausgehend von Keton **1** zum Enon **2** jeweils katalysiert durch (*S*)-Prolin.

Das große Potential dieser chiralen Katalysatoren wurde jedoch erst mit Veröffentlichungen von LIST und BARBAS voll erkannt, die darauf verwiesen, dass Prolin für intramolekulare asymmetrische Aldolreaktionen einsetzbar ist.^[9] Seitdem wurden viele verbesserte Organokatalysatoren entwickelt und ihre Anwendbarkeit für eine große Zahl an asymmetrischen Prozessen beschrieben. Es ist allgemein eine breite Auswahl an Substraten umsetzbar, jedoch sind Aldolreaktionen mit aliphatischen Aldehyden immer noch problematisch. Individuelle Organokatalysatoren sind nicht zwangsläufig dazu in der Lage, mit konsistenter Selektivität *syn*- oder *anti*-Aldolprodukte zu erzeugen, und das Ausmaß an erreichter Diastereoselektivität ist häufig nur moderat. Die Bildung von *syn*- und *anti*-Addukten ist zudem von den Donorsubstraten selbst abhängig.^[9]

1.1.2 Enzyme und katalytische Antikörper in Aldolreaktionen

Die Organische Synthese ist heutzutage immer noch stark von organischen Lösungsmitteln abhängig, obwohl der Einsatz von Wasser eine nachhaltige Ressource darstellt, welche durch ihr hohes Vorkommen und vom

Standpunkt der "Grünen Chemie" aus ihre Umweltverträglichkeit besteht. Der Einsatz großer Mengen von organischen Lösungsmitteln lässt sich dadurch erklären, dass viele Reaktanden nur schlecht in Wasser löslich sind und viele der bekannten Katalysatorsysteme unter wässrigen Bedingungen zersetzt oder deaktiviert werden. Als Inspiration für Chemiker dienen enzymkatalysierte Reaktionen, die typischerweise in wässriger Umgebung stattfinden. Ein entscheidender Vorteil von Enzymen ist, dass durch stereoelektronische Effekte wie Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals Wechselwirkungen in der Enzymtasche der Übergangszustand relativ zur rein solvatisierten Situation stabilisiert werden kann, wodurch ein hoher Grad an Stereokontrolle erreicht wird. Darum wurden enorme Bemühungen unternommen, um Reaktionen zu finden, die in wässrigen Medien stereoselektiv ablaufen.

In der Natur sind Aldolasen für stereoselektive Aldolreaktionen zuständig. Diese Enzyme dienen *in vivo* unter anderem dem Aufbau von Kohlenhydraten. Eine große Herausforderung der asymmetrischen Katalyse in Wasser liegt darin, dass nicht-kovalente Interaktionen zwischen Substrat und einem chiralen Katalysator unter polaren Bedingungen wegen der Konkurrenz mit dem überproportional vorhandenen Solvens beeinträchtigt sind. Folglich sollte eine kovalente Katalyse besser geeignet sein, um diese Problematik zu umgehen und damit effiziente asymmetrische Katalyse zu ermöglichen. Ein eklatanter Nachteil von Enzymen ist, dass diese bisher nicht von Grund auf gestaltet und synthetisiert werden können.^[10] Daraus folgt, dass einige synthetisch nützliche Transformationen, welche in der Natur nicht oder nur rudimentär vorhanden sind, enzymatisch nicht katalysiert werden können. Weiterhin ist die Suche nach Biokatalysatoren, die gegenteilige stereochemische Umsetzungen ermöglichen, extrem zeit- und arbeitsaufwändig. Diese Lücke lässt sich eventuell durch die Entwicklung synthetischer Enzyme schließen. Es wurden zwei Strategien entwickelt, um künstliche Enzyme zu generieren, wobei im Folgenden nur auf Erstere kurz eingegangen wird: Eine Möglichkeit besteht in der Nutzung katalytischer Antikörper und eine weitere im „Computational Design“ auf der Basis bereits bekannter Proteingerüste.^[3] Die aus dem Immunsystem entnommenen Antikörper sind Proteine, welche den Körper gegen fremde Antigene wie pathogene Bakterien, Viren, Parasiten und Krebszellen schützen. Antikörper können, neben ihrem üblichen Einsatz als Werkzeug zur Detektion, Isolierung und Analyse von biologischen Materialien, auch in der chemischen Synthese eingesetzt werden. Vereinfacht betrachtet sind Antikörper „Enzyme mit einem aktiven Zentrum, die keinen chemischen Operator besitzen“, folglich der Name „Abzym“ aus dem englischen für „antibody enzyme“. Die gewünschten Abzyme können durch Immunisierung eines Tieres mit Übergangszustandsanaloga einer gegebenen Reaktion gebildet werden. LERNER und SCHULTZ entwickelten 1986 die ersten Abzyme als Alternativen zu Enzymen.^[11-12] Versuche diese als chirale Katalysatoren für Aldolreaktionen einzusetzen, finden sich bereits 1995.^[13] Alle Informationen, die bis dato aus dem Einsatz von Abzymen gewonnen werden konnten, helfen das Bild von Enzymmechanismen zu verbessern, jedoch werden sie wahrscheinlich keine prominente Rolle in präparativen Biotransformationen spielen.^[14] Abzyme weisen im Vergleich zu natürlichen Enzymen gewisse Vorzüge auf, denn sie stellen einerseits einen einzigartigen Weg zu künstlichen, maßgeschneiderten enzymartigen Katalysatoren dar, welche kein äquivalentes Gegenstück innerhalb der Gruppe der natürlich vorkommenden Enzyme findet. Zudem ist prinzipiell auch mit derselben Technologie eine Konstruktion von Katalysatoren möglich, die jeweils gegensätzliche stereochemische Präferenzen aufweisen. Nachteilig ist, dass bisher die spezifische katalytische Aktivität im Vergleich zu natürlichen Enzymen deutlich geringer ist. Die Produktion im größeren Maßstab ist in der Regel umständlich^[15] und Reaktionsansätze sind auf den millimolaren Bereich begrenzt.^[16-18] Weiterhin führt eine hohe Bindungsenergie von bis zu 20 kcal/mol für das Substrat und das Produkt zu Inhibitionseffekten.^[19]

1.1.3 Indirekte und direkte metall- und metalloidekatalysierte Aldolreaktionen

Katalytische Aldolreaktionen sind ein wirksames Werkzeug zur Knüpfung von C–C-Bindungen. Nichtsdestotrotz kann es problematisch sein gekreuzte Aldolreaktionen durchzuführen, da diverse Nebenreaktionen wie Selbstkondensation, Mehrfachaddition und Dehydratisierung auftreten können und somit die Ausbeute, Regio- und Stereoselektivität der gewünschten Produktbildung geschmälert werden können. Chirale Metallkatalysatoren finden in der Synthese eine breite Anwendung, speziell für Varianten der Mukaiyamareaktion und der direkten metallkatalysierten Aldolreaktion. Hierbei wird zuerst die als Donor auftretende Carbonylverbindung in ein Metall- oder Metalloid-Enolat überführt, welches dann mit der Akzeptorcarbonylverbindung umgesetzt wird. Die selektive Bildung des Enolats hat den Vorteil, dass oben genannte Nebenreaktionen unterdrückt werden können.

Grundlegend gibt es zwei Methoden, um Enolate zu bilden. Einerseits können Enolate in instabile, jedoch höchst reaktive Metallenolate überführt werden, wobei häufig Lithium- oder Borenolate genutzt werden. Diese besitzen den Vorteil, dass sie direkt mit dem Akzeptor reagieren, ohne dass Letzterer aktiviert werden muss. Diese Reaktionen können bereits bei sehr niedrigen Reaktionstemperaturen ablaufen. Nachteilig bei dieser Methode ist, dass die Enolate in der Regel außergewöhnlich reaktiv sind und es folglich schwierig ist, die Stereoselektivität zu kontrollieren. Eine weitere Methode besteht darin, stabile und isolabile, aber weniger reaktive Metall- oder Metalloid-Enolate zu verwenden. Beispielsweise können Silylenolether eingesetzt werden, welche nur dann mit dem Akzeptor reagieren, wenn ein Aktivierungsmittel eingesetzt wird. Die Wahl des Aktivierungsmittels hat zudem den Effekt, dass sich die Reaktivität der Reaktion modulieren lässt und für den Fall, dass das Aktivierungsmittel chiral ist, katalytische enantioselektive Aldolreaktionen ermöglicht werden. Der Vorzug beider Methoden liegt darin, dass die Aldolreaktionen unter kinetisch kontrollierten Bedingungen stereoselektiv ablaufen können. Die Stereoselektivität von Metallkatalysatoren kann folglich durch die Ligandenstruktur, das Metallzentrum und/oder den Einsatz von Additiven im Reaktionsmedium gesteuert werden, was ihnen einen größeren Vorteil gegenüber chiralen Auxiliaren gibt. Metallkatalysatoren sind hingegen eingeschränkter, was die strukturelle Vielfalt der eingesetzten Substrate betrifft. Infolgedessen sind Screenings zur Bestimmung eines optimalen Katalysators für eine gegebene Synthese oft unausweichlich.

Obwohl der Einsatz von vorgebildeten Enolaten das Selektivitätsproblem in gekreuzten Aldolreaktionen umgeht, besitzen direkte Aldolreaktionen den Vorteil, dass sie atomökonomischer sind. Seit den 1980iger Jahren werden enantioselektive Katalysatoren für direkte Aldolreaktionen untersucht. Inspiriert wurden diese Systeme von Typ II-Aldolasen, die ein zweiwertiges Metallion (häufig Zinkionen) besitzen, welches eine Enolatbildung unterstützt.^[20] Erste Versuche basierten auf Lewis-aciden Metallkomplexen, welche die enolisierbare Carbonylverbindung *in situ* in ein Enolat überführen, wobei der umgebende Metall-Ligand-Komplex die Enantioselektivität steuert.

1.1.4 Zusammenfassung Aldolreaktionen

Chirale Auxiliare und Organokatalysatoren sind üblicherweise einfach strukturiert, wobei jedoch ein hoher Grad an Asymmetrie induziert werden kann. Metallkatalysatoren hingegen zeichnen sich durch komplexe Strukturen und teils sehr teure Liganden aus, wodurch sie ebenfalls eine gleichwertige Selektivität erreichen. Die meisten Organokatalysatoren sowie chiralen Auxiliare stammen aus dem *Chiral Pool*, wohingegen Metallkatalysatoren häufig selbst durch eine asymmetrische Synthese erhalten werden. Die asymmetrische katalysierte

Aldolreaktion ist für sich genommen ein eleganter und ökonomischer Prozess, um β -Hydroxycarbonylverbindungen in optisch reiner Form herzustellen, für den eine große Bandbreite an Katalysatoren sowie Katalysatortypen existiert. Historisch betrachtet gab die enantioselektive Mukaiyamareaktion den Anstoß, dass chirale Reagenzien für enantioselektive Aldolreaktionen verwendet werden können.^[3] Der historische Folgeschritt war die Entwicklung direkter asymmetrischer Aldolreaktionen, welche bereits einen hohen Grad an Atomökonomie aufweisen. Die Entwicklung stabiler Organokatalysatoren führte zu einem „grünen“ Ansatz in der asymmetrischen Aldolchemie, da hierdurch erste Synthesen in nicht-organischen Lösungsmitteln etabliert wurden. Die nächste Stufe in der historischen Entwicklung sollten folglich Proteine sein, in Form von Enzymen oder Abzymen, da diese sowohl die höchste Atomökonomie^[21] besitzen als auch am ehesten unter Bedingungen aktiv sind, die den Grundprinzipien der „Grünen Chemie“ entsprechen.^[22] Die verschiedenen Katalysatoren sind einzig dadurch beschränkt, dass in einigen Fällen nur strukturell einfachere Substrate umgesetzt werden können und die Methoden oft nicht modular anwendbar sind. Ideal wäre ein Katalysatorsystem, welches eine große Substratpromiskuität besitzt und modular ist, wie es beispielsweise bei der vielseitig einsetzbaren asymmetrischen Dihydroxylierung nach SHARPLESS der Fall ist. Ein solcher Katalysator sollte einschränkungsfrei und wahlweise regio-, diastereo- oder enantioselektiv sein. Da bis heute aber keine universell einsetzbaren Katalysatoren für Aldolreaktionen existieren, ist der moderne Synthesechemiker darauf angewiesen, die gegebenen Katalysatoren als sich ergänzende Werkzeuge zu betrachten.^[6]

1.2 Aldolasen

Wenn man die bemerkenswerte Komplexität und Varianz von Molekülen in der Natur betrachtet, dann lässt sich daraus schließen, dass die Enzyme, die für deren Synthesen verantwortlich sind, einen immensen synthetischen Nutzen aufweisen. Aldolasen sind aufgrund ihrer Eigenschaft, asymmetrische C–C-Bindungen zu knüpfen, eine der wichtigsten Enzymklassen zur Konstruktion komplexer chiraler Moleküle. Aldolasen folgen zudem den Prinzipien der „Grünen Chemie“.^[22] Die katalysierten Reaktionen verlaufen atomökonomisch, da zwei Substrate zu einem Additionsprodukt umgesetzt werden, wobei im Regelfall keine Nebenprodukte anfallen und Cofaktoren, mit Ausnahme von Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängigen Aldolasen, nicht notwendig sind. Sie weisen gegenüber hydroxylierten Verbindungen eine gute Reaktivität auf, was mitunter darauf zurückzuführen ist, dass diese im Kohlenhydratstoffwechsel eine wichtige Rolle spielen. Da Enzyme für wässrige Reaktionssysteme geschaffen wurden, ist es nicht verwunderlich, dass sich die meisten Reaktionen unter milden Bedingungen (Raumtemperatur; Normaldruck; pH 7; Wasser) durchführen lassen, womit sich Reaktionen in schädlicheren Lösungsmitteln oder mit starken Säuren/Basen umgehen lassen. In Anbetracht eines chemischen Nutzens kann auf den Einsatz von Cosolventien jedoch nicht immer vollständig verzichtet werden, da die Löslichkeit unpolarer Substrate in Wasser alleine oft zu niedrig ist. Bei den meisten Reaktionen sind nur die umzusetzenden Substrate und der Katalysator (= Enzym) nötig, sodass auf Derivatisierungsreagenzien verzichtet werden kann. Das Temperaturoptimum liegt in der Regel um bzw. knapp oberhalb von Raumtemperatur, wodurch Energieeffizienz gewährleistet wird. Es ist jedoch anzumerken, dass thermostabile Enzyme den Vorzug aufweisen, dass Reaktionen bei höheren Temperaturen weitaus schneller ablaufen können, ohne dass der Katalysator beschädigt wird, was die Raum-Zeit-Ausbeute erhöht und daher Kosten einspart, obwohl hier wiederum Heizenergie nötig ist. Weiterhin stammen Enzyme aus nachhaltigen Quellen, da diese in den meisten Fällen preiswert in Bakterien exprimiert werden können.

Obwohl rein chemische, asymmetrische Methoden zur C-C-Bindungsknüpfung in Bezug auf präparativen Nutzen sehr weit entwickelt sind, befinden sich asymmetrische Aldolreaktionen in Wasser, insbesondere katalysiert durch Enzyme, noch in den Anfängen (Kapitel 1.1.2). Aldolasen sind eine Klasse von Lyasen, welche die reversible stereoselektive Addition eines Aldoldonors (Nukleophil) an einen Akzeptor (Elektrophil) katalysieren. Im Metabolismus sind Aldolasen hauptsächlich bei der Herstellung von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Hydroxysäuren beteiligt. Die erzeugten Produkte werden üblicherweise als β -Hydroxycarbonylverbindungen klassifiziert; ein Strukturelement, welches auch in Gerüsten komplexer Naturstoffe vorkommt. Diese Strukturen lassen sich einfach und schnell unter milden Reaktionsbedingungen herstellen, ohne dass mühsame und zeitaufwändige Reaktionsschritte für Schutzgruppenumwandlungen nötig sind, wobei eine hohe chemische Effizienz und ein hoher Grad an Stereoselektivität erhalten bleibt.

1.2.1 Klassifizierung von Aldolasen

Die unterschiedlichen Arten von Aldolasen werden in drei Klassen eingeteilt (Abbildung 2). Aldolasen der Klasse I finden sich in allen Organismen von Prokaryoten hin zu Eukaryoten. Sie besitzen im aktiven Zentrum ein Lysin, dessen ϵ -Aminogruppe mit dem Aldoldonor ein Enamin als aktive Nukleophilspezies ausbildet.^[23] Durch *in situ*-Reduktion des Enzym-Substratkomplexes mit Natriumborhydrid lässt sich dieser Typ mittels vollständiger Enzymdesaktivierung nachweisen.^[24] Aldolasen der Klasse II kommen nur in Prokaryoten und niederen Eukaryoten wie Hefe, Algen und Pilzen vor.^[25] Bei diesen befindet sich im aktiven Zentrum ein zweiwertiges Metallion (meist Zn^{2+} , in seltenen Fällen auch Fe^{2+} , Mg^{2+} oder Co^{2+}),^[26] welches als Lewisäure agiert und mit dem Aldoldonor ein Enolat ausbildet.^[20] Inhibition bei Zugabe von chelatisierenden Verbindungen wie EDTA lässt auf das Vorhandensein einer Klasse II-Aldolase schließen.^[27] Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängige Aldolasen stellen eine dritte Klasse dar, wobei PLP mit dem Donorsubstrat ein chinoides Intermediat ausbildet.^[28]

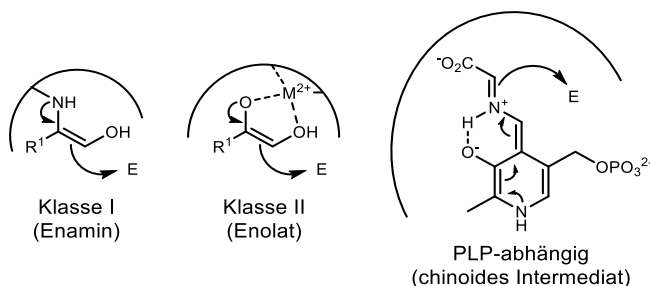
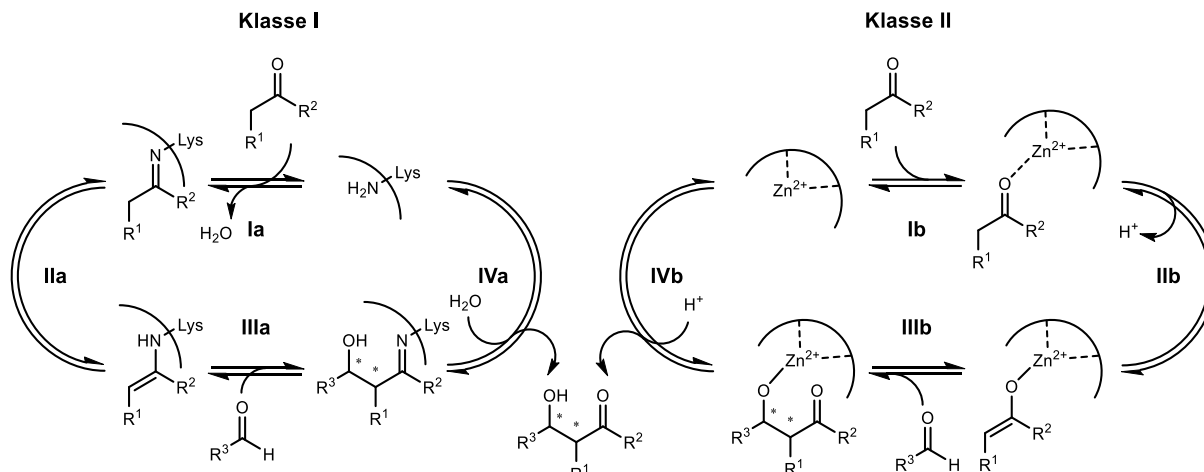


Abbildung 2. Nukleophile Aktivierung von Klasse I-, Klasse II- und PLP-abhängigen Aldolasen. M^{2+} : Übergangsmetall(II)-Ion (häufig Zn^{2+}). E: Elektrophil.^[29]

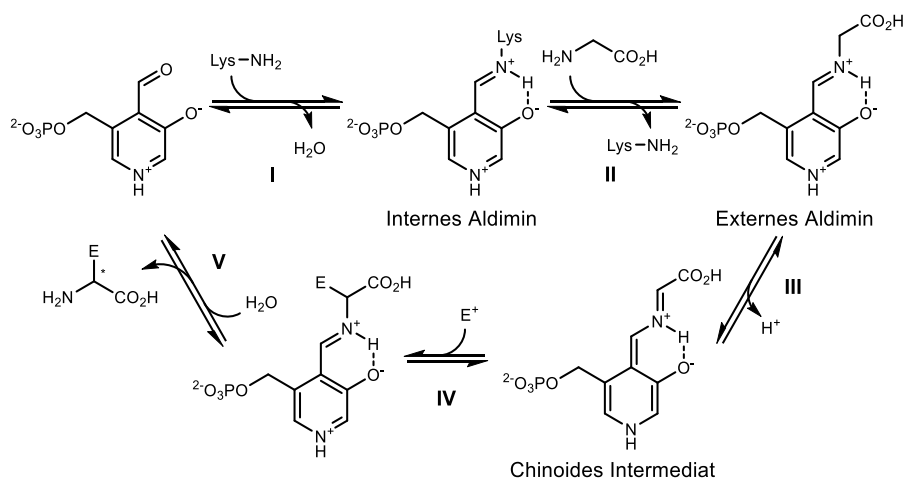
Mechanistisch betrachtet binden Klasse I-Aldolasen den Aldoldonor im aktiven Zentrum über einen Lysinrest als Schiff'sche Base (Schema 3, **Ia**), welche sich zum Enamin umlagert (**IIa**). Das Enamin greift daraufhin den Aldolakzeptor nukleophil an (**IIIa**), wobei bis zu zwei neue Stereozentren gebildet werden. Durch Hydrolyse wird die β -Hydroxycarbonylverbindung freigesetzt und das katalytisch aktive Lysin steht für einen neuen Katalysezyklus wieder zur Verfügung (**IVa**).

Bei Klasse II-Aldolasen wird im ersten Katalyseschritt der Aldoldonor über eine Lewisäure aktiviert (Schema 3, **Ib**), woraufhin sich unter Protonenabstraktion ein Enolat ausbildet (**IIb**). Das Metall-enolat greift nukleophil den Aldolakzeptor an, wodurch die β -Hydroxycarbonylverbindung gebildet wird (**IIIb**). Durch Protonierung wird der Katalysator regeneriert und die β -Hydroxycarbonylverbindung freigesetzt (**IVb**).



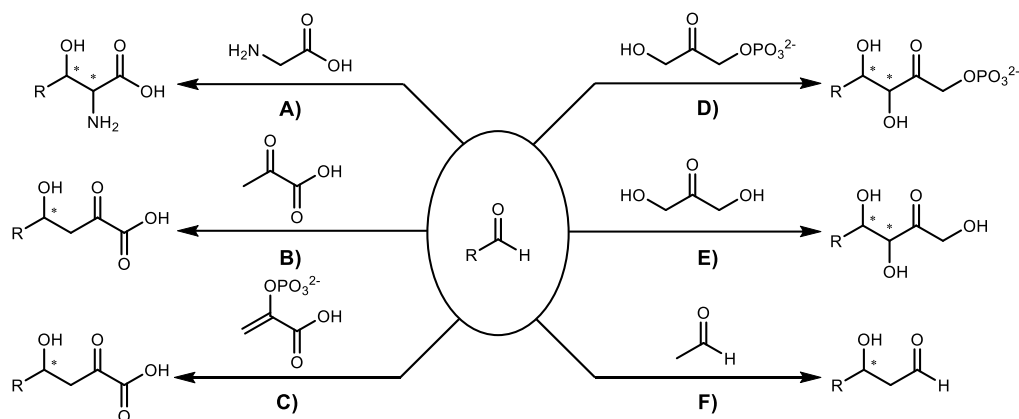
Schema 3. Katalysezyklus von Klasse I- (links) und Klasse II-Aldolasen (rechts). **Ia:** Kovalente Bindung des Aldondonors an Lysin. **IIa:** Umlagerung der Schiff'schen Base zum Enamin, **IIIa:** Addition des Aldolakzeptors, **IVa:** Hydrolyse der β-Hydroxycarbonylverbindung unter Rückgewinnung des Katalysators, **Ib:** Aktivierung des Aldondonors durch Lewis-Säure-Wechselwirkung, **IIb:** Deprotonierung und Ausbildung des Enolats, **IIIb:** Addition des Aldolakzeptors, **IVb:** Abspaltung der β-Hydroxycarbonylverbindung durch Protonierung.

Bei PLP-abhängigen Aldolasen bilden im aktiven Zentrum ein Lysin und der Cofaktor PLP ein internes Aldimin aus (Schema 4, **I**), welches durch Glycin als Amin-Nukleophil angegriffen wird und dadurch ein externes Aldimin bildet (**II**). Letzteres tautomerisiert zu einem chinoiden Intermediat (**III**), welches nukleophil eine Carbonylverbindung angreifen kann (**IV**). Durch Hydrolyse wird der Cofaktor PLP regeneriert, wodurch der Katalysezyklus erneut beginnen kann (**V**).



Schema 4. Katalysezyklus PLP-abhängiger Aldolasen.^[30] **I:** Bildung eines internen Aldimins aus dem Cofaktor PLP und einem Lysinrest im aktiven Zentrum. **II:** Austausch des gebundenen Lysins gegen Glycin zum externen Aldimin. **III:** Tautomerisierung zum chinoiden Intermediat. **IV:** Angriff des chinoiden Intermediats an ein Elektrophil (E⁺). **V:** Hydrolyse des Produkts und Regeneration des Cofaktors.

Aldolasen besitzen üblicherweise eine hohe Selektivität gegenüber ihren Donorsubstraten und tolerieren normalerweise nur kleine, isosterische strukturelle Modifikationen. Sie lassen sich daher neben dem Katalysemechanismus zusätzlich über ihre Spezifität für ihren Aldondonor differenzieren. Die bisher bekannten Aldolasen lassen sich pro forma in sechs Klassen einteilen, dazu gehören Glycin-, Pyruvat-, Phosphoenolpyruvat-(PEP)-, Dihydroxyacetonphosphat (DHAP)-, Dihydroxyaceton (DHA)- und Acetaldehyd-abhängige Aldolasen (Schema 5).

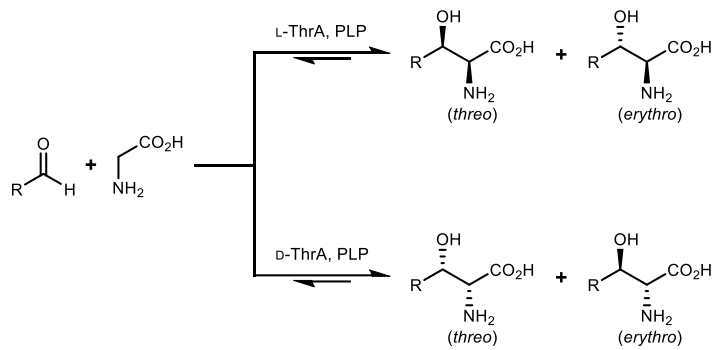


Schema 5. Klassifizierung von Aldolasen nach Abhängigkeit ihres Donors: **A)** Glycin, **B)** Pyruvat, **C)** Phosphoenolpyruvat, **D)** Dihydroxyacetonphosphat, **E)** Dihydroxyaceton und **F)** Acetaldehyd.

Wichtig für Anwendungen von Aldolasen in der Synthese ist, dass diese trotz eingeschränkter Donorselektivität ein strukturell breites Spektrum an Aldolakzeptoren umsetzen können. Die hohe Selektivität und Affinität für das Donormolekül erleichtern die Katalyse. Eine korrekte diastereofaciale Unterscheidung wird einerseits durch Verhinderung des Zugangs des Lösungsmittels auf das gebundene Nukleophil und andererseits durch die Abschirmung einer der enantiotopen Seiten ermöglicht. Stereochemisch betrachtet erfolgt die Annäherung des Aldolakzeptors an den Enzym-Donorkomplex stereospezifisch. Die Differenzierung des Angriffs von der *Re*- oder *Si*-Seite der Akzeptorcarbonylverbindung ist üblicherweise hoch, kann aber in einigen Fällen von der Substratstruktur abhängen, sodass eine andere stereochemische Präferenz als beim natürlichen Substrat zu beobachten ist. Obwohl enzymatische Aldolreaktionen reversibel sind, ist die C–C-Knüpfung dadurch favorisiert, dass die gebildeten Aldoladdukte oftmals stabile zyklische Isomere bilden können.^[31] Für praktische Anwendungen und für den Fall, dass die Reaktionsprodukte nicht durch Zyklisierung stabilisiert werden können, kann das Reaktionsgleichgewicht durch einen Überschuss eines der Reaktanden (Akzeptor oder Donor) auf die Produktseite verschoben werden, wobei die Wahl des Überschussreagenzes nach Kriterien von Kosten, Verfügbarkeit und Praktikabilität gefällt wird. Weiterhin muss eine potentielle Inhibition des Enzyms durch höhere Konzentrationen eines der Reaktanden mit berücksichtigt werden.^[32]

1.2.2 Glycin-abhängige Aldolasen

Aldoladditionen von Glycin an Aldehyde kann mit PLP-abhängigen Aldolasen wie der L-Threonin-Aldolase (ThrA; EC 4.1.2.5) oder der Serinhydroxymethyltransferase (SHMT; EC 2.1.2.1) vermittelt werden. ThrA ist die am häufigsten untersuchte Glycin-abhängige Aldolase. Sie katalysiert *in vivo* die reversible Spaltung von Threonin in Glycin und Acetaldehyd. Diese Aldolase ist im Allgemeinen in der Lage, eine große Anzahl an aliphatischen und aromatischen Aldehyden umzusetzen, wobei aromatische Verbindungen mit elektronenziehenden Gruppen am besten geeignet sind.^[33] Sie kann weiterhin zur Synthese von β -Hydroxy- α -Aminosäuren genutzt werden, wobei natürlich vorkommende Aminosäuren wie L-Threonin oder L-Serin sowie Bausteine für komplexere biologisch aktive Naturstoffe wie Antibiotika oder Immunsuppressiva (z. B. Vancomycin, Cyclosporin, Katanosin) synthetisiert werden können. Da bei der C–C-Knüpfung zwei neue stereogene Zentren erzeugt werden, können vier Diastereomere entstehen (Schema 6).^[34-36]

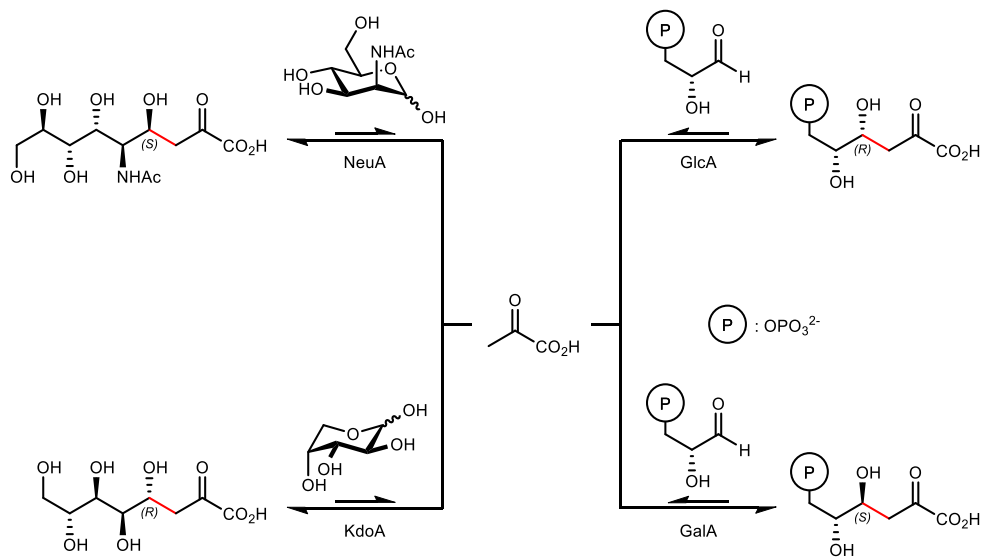


Schema 6. Aldoladdition von Glycin an Aldehyde durch Threonin-Aldolasen.

Die Reaktion verläuft unter vollständiger Kontrolle der Stereochemie am α -C-Atom des Aldoldonors, jedoch meist mit unzureichender kinetischer Stereoselektivität am β -C-Atom, woraus eine hohe Enantio-, aber geringe Diastereoselektivität resultiert.^[33,37] Da die gebildeten Reaktionsprodukte nicht durch Ringbildung stabilisiert werden können, sind üblicherweise große Mengen an Glycin nötig, um das Reaktionsgleichgewicht auf Produktseite zu verschieben.

1.2.3 Pyruvat- und Phosphoenolpyruvat-abhängige Aldolasen

Einige Aldolasen kommen *in vivo* im Abbau von Zuckersäuren vor, wo sie Pyruvat als Aldoldonor abspalten. PEP-abhängige Aldolasen kommen komplementär in der Biosynthese von Ketosäuren vor. Beide Klassen von Enzymen können daher gleichsinnig genutzt werden, um dieselben Ketosäuren herzustellen.^[38] Einer der wichtigsten Vertreter ist die *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase (NeuA; EC 4.1.3.3) der Klasse I, wegen ihrer großen Substrattoleranz alternativ auch Sialinsäure-Aldolase genannt,^[32] welche die reversible Aldoladdition von Pyruvat an *N*-Acetyl-D-mannosamin zur *N*-Acetyl-D-neuraminsäure katalysiert (Schema 7). NeuA kann ebenfalls konfigurrell verwandte Aldopentosen- und hexosen umsetzen.

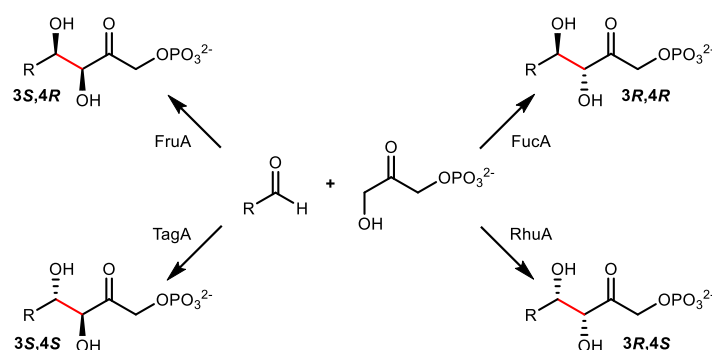


Schema 7. Stereokomplementäres Set von Pyruvat-abhängigen Aldolasen: *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase (NeuA), 2-Keto-3-desoxy- α -D-manno-octulosonat-Aldolase (KdoA), 2-Keto-3-desoxy-6-phospho-D-gluconat-Aldolase (GlcA) und 2-Keto-3-desoxy-6-phospho-D-galactonat-Aldolase (GalA). Rot: Neu geknüpfte C–C-Bindung.^[39]

Die meisten Pyruvat-abhängigen Aldolasen sind Klasse I-Aldolasen. Die bekanntesten Vertreter sind die 2-Keto-3-desoxy- α -D-*manno*-octulosonat-Aldolase (KdoA; EC 4.1.2.23), welche D-Arabinose als Akzeptor nutzt, und die funktionell verwandten Enzyme 2-Keto-3-desoxy-6-phospho-D-gluconat-Aldolase (GlcA; EC 4.1.2.14) sowie 2-Keto-3-desoxy-6-phospho-D-galactonat-Aldolase (GalA; EC 4.1.2.21), die D-Glycerinaldehyd-3-phosphat oder kleinere Aldehyde als Elektrophil bevorzugen.^[39] Bei den meisten Pyruvat-abhängigen Aldolasen liegt das Reaktionsgleichgewicht stark auf Seiten der Edukte, sodass ein großer Überschuss an Pyruvat nötig ist, um das Gleichgewicht zugunsten präparativ nutzbarer Reaktionsumsätze zu verschieben.

1.2.4 DHAP-abhängige Aldolasen

Der wichtigste Vorzug DHAP-abhängiger Aldolasen besteht darin, dass ein vollständiger Satz stereoselektiver Enzyme komplementär eingesetzt werden kann, um alle vier Diastereomere zu erzeugen (Schema 8).^[26,40] Die bekanntesten Vertreter sind die D-Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (FruA; EC 4.1.2.13), L-Fucose-1-phosphat-Aldolase (FucA; 4.1.2.17), L-Rhamnulose-1-phosphat-Aldolase (RhuA; 4.1.2.19) und D-Tagatose-1,6-bisphosphat-Aldolase (TagA; EC 4.1.2.40). Diese vier Aldolasen katalysieren *in vivo* die reversible asymmetrische Aldoladdition von DHAP an D-Glycerinaldehyd-3-phosphat oder L-Lactaldehyd. DHAP-abhängige Aldolasen können sowohl der Klasse I oder II angehören. FucA und RhuA sind Klasse II-Aldolasen, während von FruA und TagA Aldolasen der Klasse I sowie Klasse II bekannt sind.^[25]



Schema 8. Komplementäre Stereochemie DHAP-abhängiger Aldolasen. D-Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (FruA), L-Fucose-1-phosphat-Aldolase (FucA), D-Tagatose-1,6-bisphosphat-Aldolase (TagA), L-Rhamnulose-1-phosphat-Aldolase (RhuA), Rot: Neu geknüpfte C–C-Bindung.

Der Einsatz DHAP-abhängiger Aldolasen in der organischen Synthese ist extrem gut untersucht. Das volle Spektrum an Akzeptorsubstraten ist bis dato nicht vollständig ausschöpfbar, die Variabilität des Donors hingegen ist deutlich größer. Der am stärksten limitierende Faktor ist die Notwendigkeit zur Synthese und Handhabung des Donors DHAP, was speziell im großen Maßstab immer noch schwierig ist.^[41] Es existieren zwar einige Methoden zur Herstellung von DHAP,^[42] insbesondere enzymatische Synthesewege, die von günstigen Startmaterialien, wie DHA, Glycerin und Glucose, ausgehen, jedoch bedarf es bei diesen Prozessen immer noch teurer Enzyme für die Katalyse. Eine Lösung der Problematik versprechen DHA-abhängige Aldolasen wie speziell die D-Fructose-6-phosphat Aldolase (FSA), welche direkt Dihydroxyaceton, Hydroxyaceton und 1-Hydroxybutan-2-on als Donorsubstrate akzeptiert.^[27,43–45] Bisher sind FSA und deren Varianten jedoch nur in der Lage, Produkte mit einer (3S,4R)-Konfiguration zu generieren, sodass DHAP-abhängige Aldolasen immer noch nötig sind, um (3R,4S)-, (3R,4R)- und (3S,4S)-Konfigurationen zu generieren.

1.2.5 DHA-abhängige Aldolasen – D-Fructose-6-phosphat-Aldolase

Die D-Fructose-6-phosphat-Aldolase (FSA) stammt aus der Unterfamilie der Transaldolasen und wurde das erste Mal in *Escherichia coli* exprimiert.^[27] Obwohl FSA eine starke sequenzielle und strukturelle Ähnlichkeit zu Transaldolasen aus Gram-positiven Bakterien und Archaeen aufweist, hat sie keine Transaldolaseaktivität, weshalb sie formell zu den Aldolasen gezählt wird. Es besteht jedoch wiederum nur geringe Sequenz-Ähnlichkeit zu DHAP-abhängigen Aldolasen. FSA ist eine Klasse I-Aldolase, mit einem aktiven Lysinrest in Position 85, nachgewiesen durch den Austausch von Lysin gegen Arginin (FSA^{K85R}), wonach keine katalytische Aktivität mehr beobachtet wurde.

Eine Untereinheit der FSA (PDB ID: 1L6W)^[24] besteht aus 220 Aminosäuren, deren Masse in etwa 23.0 kDa beträgt (gemessene Masse, durch Q-TOF MS: $M_R = 22998$ Da)^[27] und eine TIM (α/β)₈-Fasstruktur aufweist. Das Enzym bildet ein Dekamer aus zwei überlagerten Pentamer-Ringen (257.000 Da) mit je fünf identischen Untereinheiten, deren C-terminale Helix jeweils das aktive Zentrum einer Nachbareinheit bedeckt (Abbildung 3).^[24]

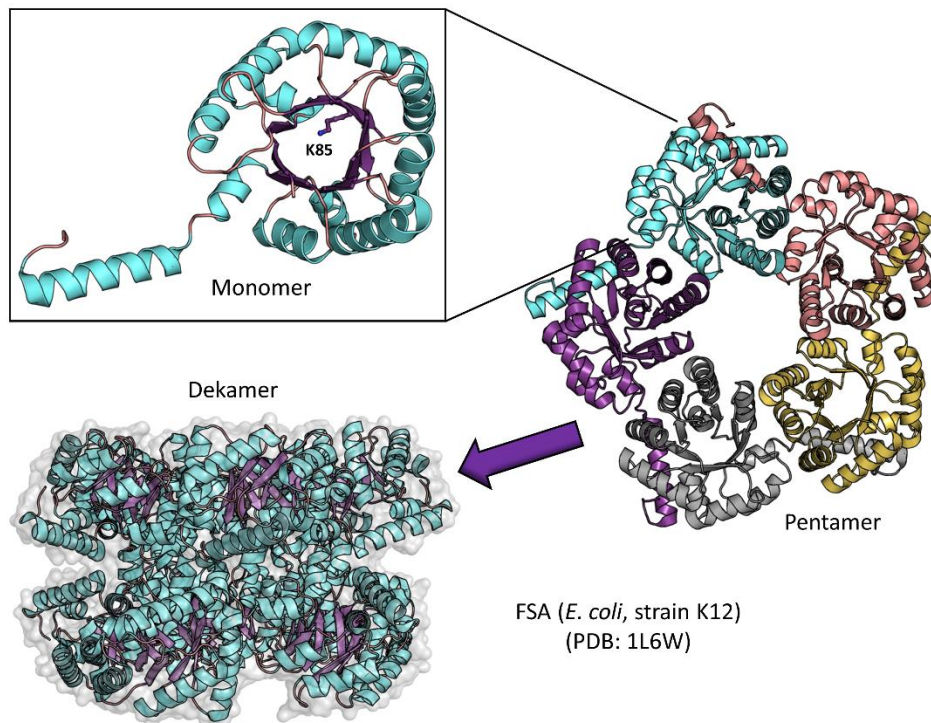


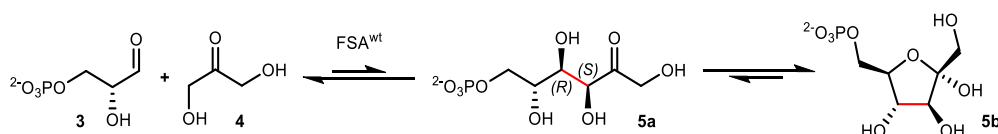
Abbildung 3. Röntgenkristallstruktur von FSA (PDB ID:1L6W). Oben links: Monomer mit 8 β -Strängen in lila (katalytisch aktives Lysin in Position 85 hervorgehoben), 8 α -Helices in türkis und den verbindenden *Loops* in altrosa; Rechts: Pentamer mit unterschiedlich gefärbten Untereinheiten; Unten links: Dekamer in der Seitenansicht. Die Bilder wurden mit PyMOL erstellt.^[46]

Obwohl die FSA aus dem mesophilen Organismus *Escherichia coli* stammt, weist sie eine bemerkenswerte Temperaturstabilität auf. Reaktionen können in Temperaturbereichen zwischen 20 und 75 °C durchgeführt werden, wobei die Halblebenszeiten bei 200 h (55 °C), 30 h (65 °C) und 16 h (75 °C) liegen, was die FSA effektiv zu einem thermostabilen Enzym macht. Die dicht gepackte Dekamerstruktur ist wahrscheinlich ein Grund für die erhöhte Temperaturstabilität.^[24] Der präparative Einsatz von Enzymen ist oft durch einen engen optimalen Temperaturbereich eingegrenzt, da die meisten Enzyme aus mesophilen Organismen (Wachstumsoptimum <45 °C) auch nur im mesophilen Bereich ein Temperaturoptimum aufweisen. Der Vorteil von Enzymen mit

höheren Temperaturoptima besteht darin, dass sie einerseits aus ihren Wirtszellen durch Hitzeschock leicht isoliert werden können und aufwändige mehrstufige chromatographische Aufreinigungsprozesse verzichtbar sind. Daher lassen sich rohe Zellextrakte direkt verwenden, weil Enzyme mit konkurrierenden Aktivitäten durch den Hitzeschock größtenteils denaturiert sind.

Das pH-Optimum der FSA liegt um pH 8.5, aber das Enzym lässt sich auch problemlos in einem breiten pH-Bereich zwischen pH 5.5–11.0 einsetzen.^[25] Zudem werden organische Cosolventien wie DMF in bis zu 20 Volumenprozent gut toleriert, was den Einsatz von weniger polaren Substraten ermöglicht.^[43-44,47-48]

In der Natur katalysiert die FSA die reversible Addition von 1,3-Dihydroxyaceton an D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (Schema 9). Es konnte bisher keine endogene FSA-Aktivität in einem Organismus gefunden werden, sodass die metabolische Rolle der FSA bislang ungeklärt ist.^[25] Die C–C-Knüpfung erfolgt diastereoselektiv in *syn*-Orientierung, wobei die Stereozentren in (3*S*,4*R*)-Konfiguration erzeugt werden.^[27,49]



Schema 9 FSA-katalysierte Reaktion zwischen D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (**3**) und Dihydroxyaceton (**4**) zu D-Fructose-6-phosphat (**5**) unter Ausbildung einer (3*S*,4*R*)-Konfiguration. Rot: Neu geknüpfte C–C-Bindung.

Im aktiven Zentrum ist zudem ein Wassermolekül an die Aminosäuren Gln59, Thr109 und Tyr131 gebunden (die Bindung zu Tyr131 ist in Abbildung 4 der Übersicht halber nicht gezeigt), wobei davon ausgegangen wird, dass dieses beim Protonentransfer während der Bildung der Schiff'schen Base eine Rolle spielt.^[24,50]

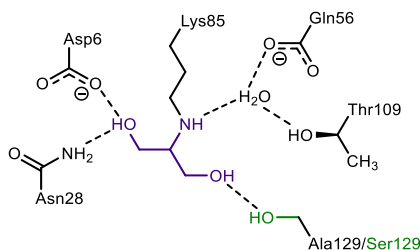
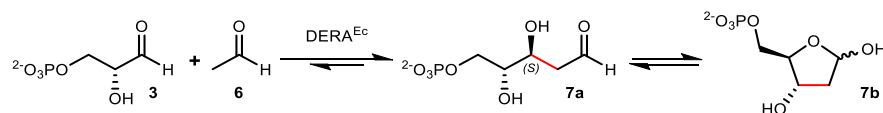


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Wechselwirkungen des reduzierten Schiff'schen Base-Intermediats (lila) mit Aminosäureresten im aktiven Zentrum. Grün: Wechselwirkung von Ser129 in FSA^{A129S} mit gebundenem reduziertem DHA (lila).^[51]

Ein Vorteil der FSA gegenüber den DHAP-abhängigen Aldolasen ist, dass nicht-phosphoryliertes DHA als Donor eingesetzt werden kann. Dies vereinfacht den Einsatz in der chemischen Synthese erheblich, da kein unnötiger Aufwand zur Synthese von DHAP erforderlich ist.^[41] Obwohl der Wildtyp der FSA als natürliches Substrat Dihydroxyaceton verwendet ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}(\text{FSA}^{\text{wt}}, \text{DHA}) = 4 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$), wurde nachgewiesen, dass Hydroxyaceton ein vergleichsweise viel besseres Substrat ist ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}(\text{FSA}^{\text{wt}}, \text{HA}) = 145 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$).^[47] Durch einen Austausch von Alanin in Position 129 gegen Serin kann die Variante FSA^{A129S} gewonnen werden, deren Donorsubstratspezifität für DHA erhöht ist ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}(\text{FSA}^{\text{A129S}}, \text{DHA}) = 69 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$).^[47] Grund hierfür ist die zusätzliche Stabilisierung von DHA durch eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxygruppe des Serinrests (Abbildung 4).

1.2.6 Acetaldehyd-abhängige Aldolasen – D-Desoxyribose-5-phosphat-Aldolase

In Jahr 1952 entdeckte RACKER in Zellextrakten von *Escherichia coli*^[52] das Enzym D-Desoxyribose-5-phosphat-Aldolase (DERA; EC 4.1.2.4). DERA katalysiert als Aldolase der Klasse I die reversible Addition von Acetaldehyd (**6**) an D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (**3**) zu D-2-Desoxyribose-5-phosphat (**7**), wobei die C–C-Bindungsknüpfung an der C3-Position (S)-selektiv verläuft (Schema 10).



Schema 10. D-Desoxyribose-5-phosphat-Aldolase (DERA)-katalysierte Reaktion zwischen D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (**3**) und Acetaldehyd (**6**) zu D-2-Desoxyribose-5-phosphat (**7**) unter Ausbildung einer (3S)-Konfiguration. Rot: Neu geknüpfte C–C-Bindung.

Das Enzym besteht aus 259 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von $M = 27.7$ kDa. Röntgenkristallstrukturen (PDB ID: 1P1X) zeigen, dass der in Position 167 befindliche Lysinrest (Lys167) in DERA^{Ec} verantwortlich für die katalytische Aktivität des Enzyms ist. Zudem ist ein zweiter Lysinrest in Position 201 (Lys201) für die Katalyse notwendig, wobei davon ausgegangen wird, dass dieser den pK_s von Lys167 beeinflusst.^[53] DERA^{Ec} liegt im Kristall als Dimer in einer $(\alpha/\beta)_8$ -Fassstruktur vor (Abbildung 5).^[54]

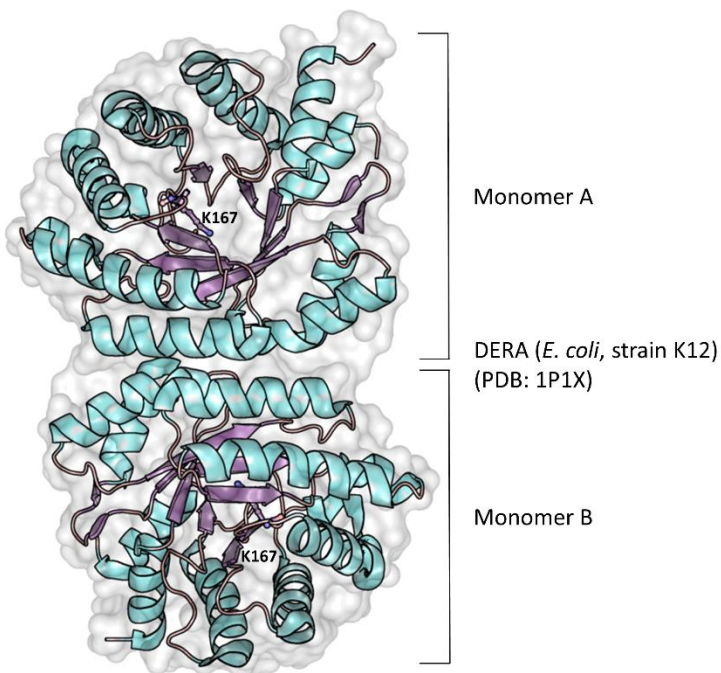
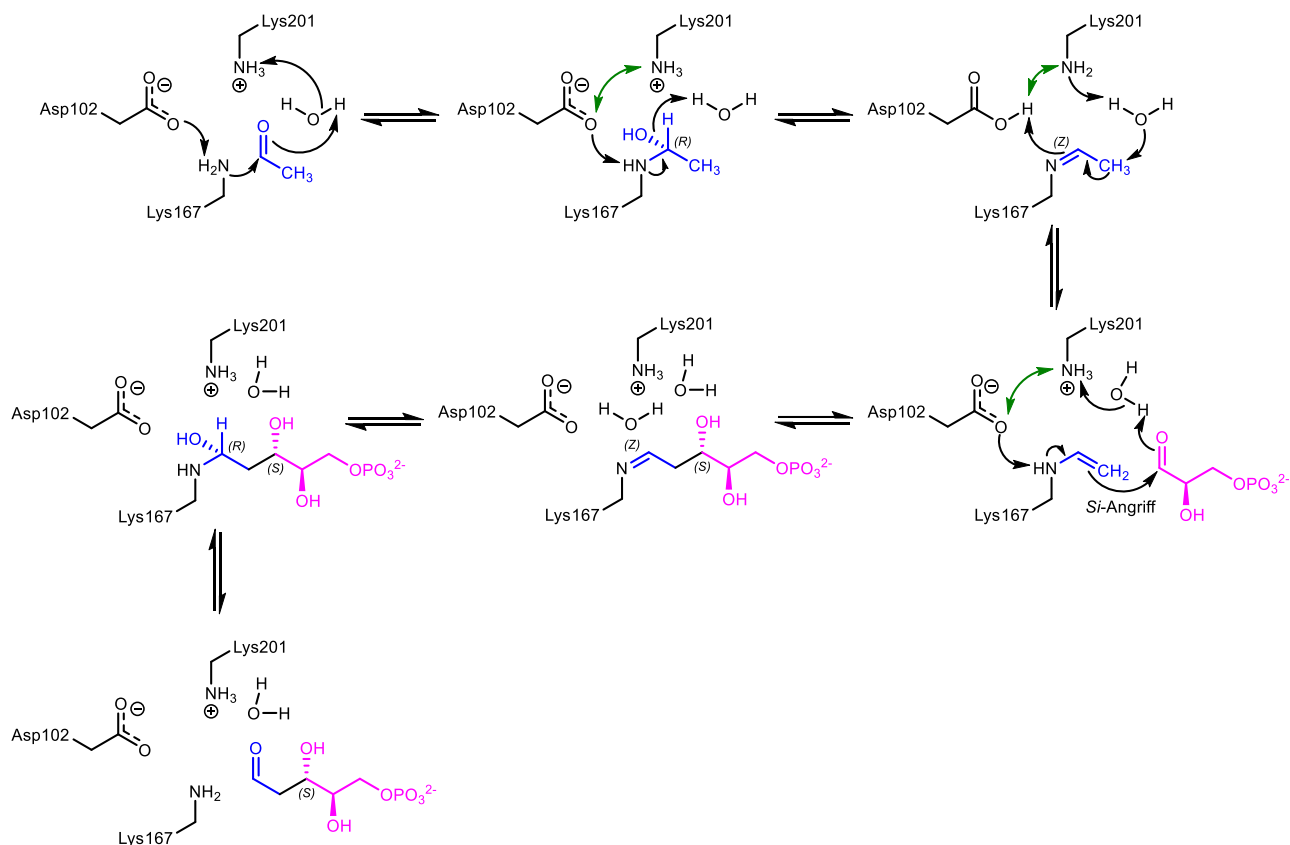


Abbildung 5. Röntgenkristallstruktur von DERA (PDB: 1P1X). Im Monomer sind 8 β -Stämme in lila (katalytisch aktives Lysin in Position 167 hervorgehoben), 8 α -Helices in türkis und die verbindenden Loops in altrosa dargestellt. Das Bild wurde mit PyMOL erstellt.^[54]

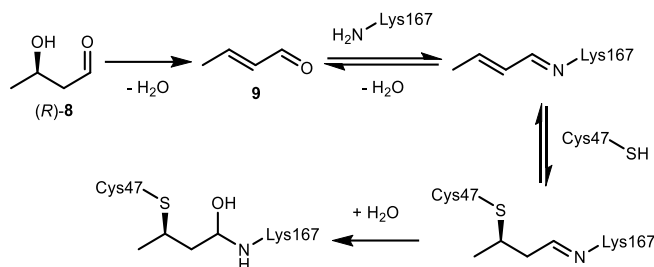
Durch Vergleiche von Kristallstrukturen aus verschiedenen Organismen kann darauf geschlossen werden, dass außerdem Wassermoleküle im aktiven Zentrum für den Katalysemechanismus von entscheidender Bedeutung sind (Schema 11).^[26,53,55] Die Addition des gebundenen Acetaldehyds an den Aldolakzeptor findet als Si-Angriff statt.



Schema 11. Katalysiemechanismus in DERA^{Ec}.^[53] Der Doppelpfeil in grün zeigt eine schnelle Protonenverschiebung zwischen Lys201 und Asp102 an.

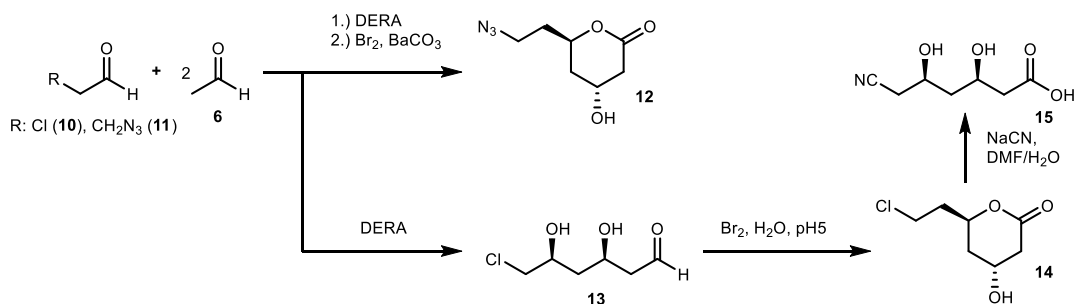
Das pH-Optimum liegt bei 7.5, wobei das Enzym in einem pH-Bereich von 6.5–8.0 ohne gravierende Aktivitätsverluste eingesetzt werden kann. Das Enzym ist zudem über kurze Zeiträume bei 25 °C in 0.1 M-TEA-Puffer lagerbar, wobei die Aktivität nach 10 Tagen auf etwa 70% absinkt.^[56]

DERA ist eine von zwei Aldolasen, die in der Lage sind, enolisierbare Aldehyde als Donor zu verwenden. Die einzige andere bekannte Aldolase, die dazu fähig ist, ist FSA (Kapitel 1.2.5). Das Enzym baut selektiv (S)-konfigurierte Stereozentren auf, wobei β -Hydroxyaldehyde oder -ketone gebildet werden. DERA toleriert diverse Aldehydakzeptoren und kann auch andere Nukleophile wie Aceton, Propanal und Fluoraceton verwenden, jedoch mit stark verringerten Umsatzraten.^[57] Obwohl DERA Acetaldehyd als Donorsubstrat verwendet, wird das Enzym durch höhere Konzentration des Substrats irreversibel inhibiert. Dies veranlasste verschiedene Forschungsgruppen nach neuen DERA-Varianten zu suchen, welche eine Toleranz gegenüber höheren Acetaldehydkonzentrationen aufweisen.^[58] Dick *et al.* haben zudem für die Homoaldolkupplung von Acetaldehyd zu (R)-3-Hydroxybutanal ((R)-**8**) gezeigt, dass Letzteres unter Wasserabspaltung Crotonaldehyd (**9**) ausbildet, welches am katalytisch aktiven Lysin in Position 167 erneut eine Schiff'sche Base bildet. Diese kann durch die Cystein-Thiolgruppe in Position 47 in einer Michael-Addition am C β -Atom angegriffen werden und so das Enzym irreversibel inhibiert werden (Schema 12).^[59]



Schema 12. Vorgeschlagener Ablauf der Inhibierung von DERA durch Crotonaldehyd (9).^[59]

Je nach Akzeptorsubstrat sind einige DERA-Varianten in der Lage, Mehrfachadditionen durchzuführen (auch in Kombination mit anderen Aldolasen), wodurch 2,4,6-Tridesoxyhexosen erhalten werden können.^[60-63] Die sequenzielle Aldoladdition ist dabei thermodynamisch kontrolliert und stoppt, sobald stabile intramolekulare Halbacetale ausgebildet werden. Ausgehend von den 2,4,6-Tridesoxyhexosen lassen sich Statinintermediate synthetisieren (Schema 13).



Schema 13. DERA-katalysierte Synthesen von Intermediaten zur Herstellung von Statinen.^[64-66]

Statine gehören zur Klasse der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A- (HMG-CoA)-Reduktase-Inhibitoren. Dabei handelt es sich um Arzneistoffe, die terminale Carbonsäuren oder δ -Lactone enthalten, Strukturelemente, die auch in den Produkten der durch DERA-katalysierten Reaktionen zu finden sind (Abbildung 6).^[64-70] Da HMG-CoA als Zwischenprodukt in der Cholesterinbiosynthese vorkommt, werden oft Statine bei Fettstoffwechselstörungen als Cholesterinsenker eingesetzt. Das bis dato am häufigsten eingesetzte Statin ist Atorvastatin (16), welches im Jahr 2012 ein Marktvolumen von 12.8 Milliarden US-Dollar aufwies.

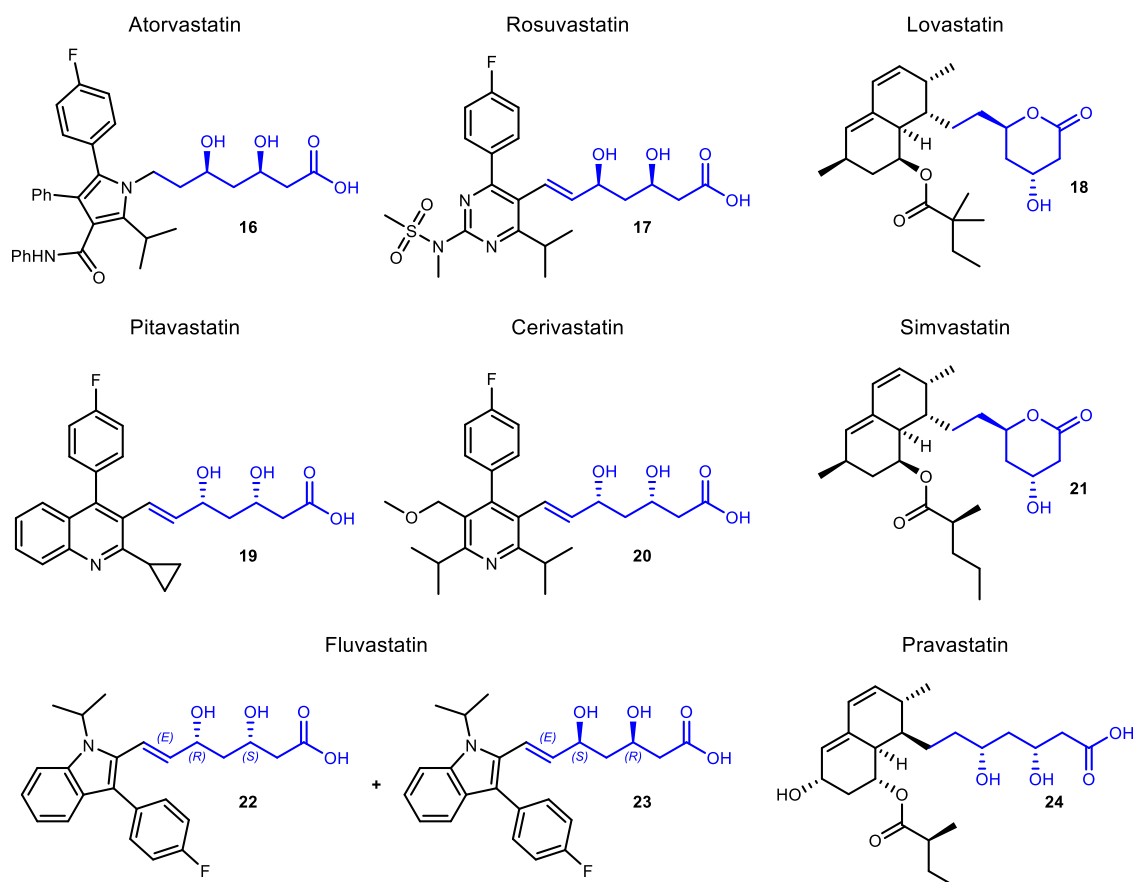


Abbildung 6. Auswahl an Statinen mit terminalen Carbonsäuren oder δ -Lactonen (jeweils in blau).

1.3 Desoxyzucker

In der Natur kommen Desoxyzucker sehr häufig vor, dabei sind diese in Eukaryoten (z. B. DNS), in Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen zu finden.^[71-72] Sie weisen nicht die gleichen Eigenschaften auf, die andere Zucker zu idealen Energiespeichern und Lieferanten machen wie beispielsweise Glucose und Fructose sowie Polymere wie Glykogen. Die Rolle von Desoxyzuckern ist eher funktioneller Natur, d. h. wenn diese an Verbindungen oder zelluläre Strukturen gebunden sind, dann verändern sie die chemischen Eigenschaften des jeweiligen Aglykons oder die immunologischen Aspekte der Zelle. Desoxyzucker kommen in Nukleinsäuren, Lipopolysacchariden^[73] und sekundären Metaboliten vor.^[74] Viele Sekundärmetabolite aus Mikroorganismen und Pflanzen, wie Antibiotika, antiparasitäre Verbindungen, Antimykotika, Cardioglykoside und Antitumorverbindungen, enthalten Desoxyzucker als Teil ihrer Struktur, deren Vorhandensein üblicherweise mit der biologischen Wirkung der Verbindung einhergeht. Ein Teil der physiologischen Wirkung lässt sich auf die erhöhte Hydrophobizität gegenüber ihren oxygenierten Analoga zurückführen.^[75] Modifikation des Desoxyzuckerparts führt in der Regel zur Änderung von pharmakokinetischen Parametern wie der Löslichkeit, Hydrophobizität, Aktivität und Toxizität.^[74]

Abhängig von der Anzahl an ersetzten Hydroxygruppen und ihrer Position können Desoxyzucker nach Desoxygenierungsgrad klassifiziert werden. Am häufigsten kommen Monodesoxyzucker vor, gefolgt von Di- und Tridesoxyzuckern. Desoxyaldosen sind häufiger anzutreffen als Desoxyketosen. Der am häufigsten vertretene Monodesoxyzucker ist die 2-Desoxy-D-ribose (**25**), welcher ein Grundbaustein der DNS ist. Ein weiteres Beispiel

für 2-Desoxyzucker ist die 2-Desoxy-D-glucose (**26**), welche pharmazeutisch mitunter zur Hemmung der Angiogenese und Metastasebildung von Tumoren eingesetzt wird.^[76] Cordycepose (3-Desoxy-D- (**27**) oder 3-Desoxy-L-arabinose (**28**)) ist ein 3-Desoxyzucker des Nukleosid-Antibiotikums Cordycepin. 4-Desoxy-D-arabino-hexose (**29**) kommt im Lipopolysaccharid von *Citrobacter braakii* vor.^[77-79] Unter den in bioaktiven Verbindungen vorhandenen Monodesoxyzuckern sind 6-Desoxyzucker am häufigsten vertreten. Typische Beispiele sind 6-Desoxy-L-mannose (L-Rhamnose, **30**), 6-Desoxy-L-galactose (L-Fucose, **31**), 6-Desoxy-D-glucose (D-Quinovose, **32**) und deren Derivate.

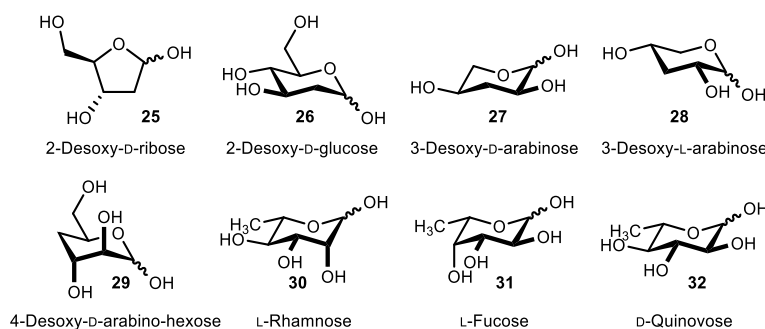
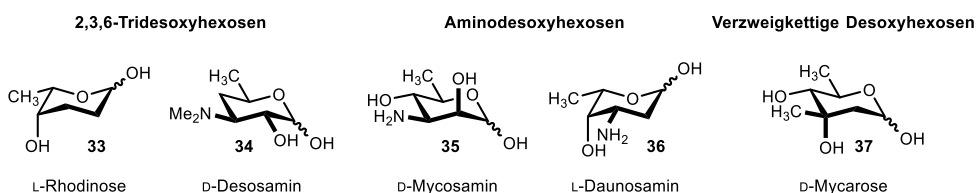


Abbildung 7. Beispiele an natürlich vorkommenden Monodesoxy-pentosen und -hexosen.

Ebenfalls von Relevanz sind Didesoxyzucker wie 2,6-Didesoxyhexosen, welche in Steroidglykosiden, Antibiotika und Antitumorverbindungen vorhanden sind, und 3,6-Didesoxyhexosen, die als antigene Determinanten (Epitope) von bakteriellen Liposacchariden Anwendung finden.^[75,80] Einige sekundäre Metaboliten enthalten 2,3,6-Tridesoxyzucker wie L-Rhodinose (**33**) in Urdamycin, Landomycin, Rhodomycin und Granaticin.^[81] Aminodesoxyzucker enthalten eine Aminogruppe, die eine der Hydroxygruppen im ursprünglichen Monosaccharid ersetzt. Sie treten in Lipopolysacchariden und bei einigen Antibiotika auf, insbesondere bei Makroliden (D-Desosamin (**34**) in Erythromycin), Polyenen (D-Mycosamin (**35**) in Amphotericin B) und Anthracyclinen (L-Daunosamin (**36**) in Doxorubicin).^[81] Schließlich werden verzweigt-kettige Desoxyzucker üblicherweise synthetisiert, indem eine Alkylseitenkette (von S-Adenosylmethionin (SAM) im Fall von Methylgruppen) an einen der Kohlenstoffe im Monosaccharid gebunden wird (beispielsweise D-Mycarose (**37**) in Mithramycin).^[81]

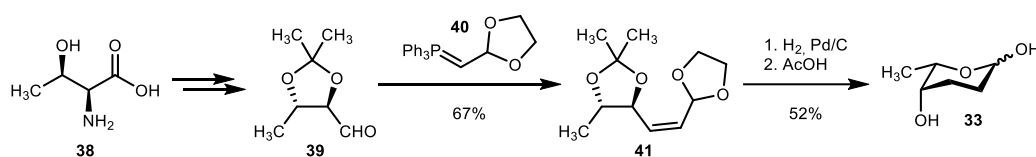


Schema 14. Beispiele natürlich vorkommender Tridesoxy-, Aminodesoxy- und verzweigt-kettigen Desoxyhexosen.

Aufgrund ihrer pharmazeutischen Bedeutung hat sich die Synthese von Desoxyzuckern zu einem wichtigen Feld in der Naturstoffsynthese entwickelt. Frühe Versuche zur Synthese von Desoxyzuckern griffen auf Substrate aus dem *Chiral Pool* zurück. Über mehrstufige Synthesen ausgehend von Kohlenhydraten wie D-Glucose, D-Mannose, L-Rhamnose, L-Fucose und anderen üblichen Zuckern konnten so diverse Desoxyzucker erhalten werden.^[82-83] Die Auswahl an natürlich vorkommenden Kohlenhydraten als geeignetes Startmaterial ist begrenzt und für die selektive Entfernung von Hydroxygruppen meist teils mehrstufige Synthesen nötig. Insbesondere der Einbau neuer funktioneller Gruppen, neuer Verzweigungspunkte oder der Wechsel von der

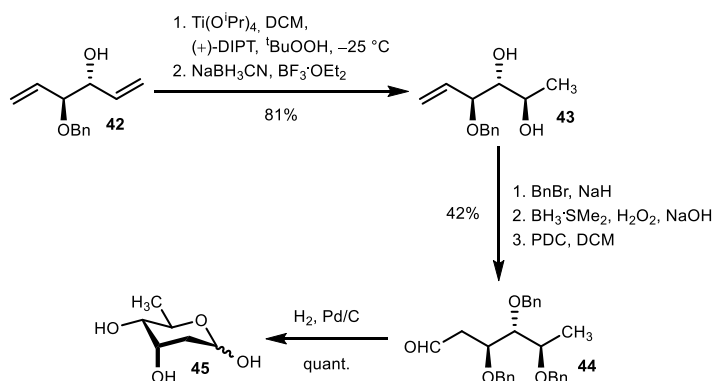
D- in die L-Serie bzw. umgekehrt ist mit viel Arbeitsaufwand verbunden. Aufgrund dessen rücken vermehrt (asymmetrische) Totalsynthesen von Desoxyzuckern in den Fokus.^[84-85]

Monodesoxyzucker lassen sich prinzipiell über viele verschiedene Methoden herstellen. Die direkte Synthese kann durch Desoxygenierung von Desoxyhalozuckern oder Sulfonaten, oder durch Radikal-vermittelte Desoxygenierung erfolgen.^[75] Allgemeine Methoden zum Aufbau von Desoxyhexosen gehen oft vom *Chiral Pool* aus. Hierbei werden gezielt Desoxy- und Aminodesoxyzucker ausgehend von Aminosäuren, α -Hydroxysäuren oder anderen chiralen Zwischenprodukten aufgebaut. Aminosäuren wie Alanin, Serin, Threonin oder Glutaminsäure können beispielsweise in Aminodesoxyhexosen durch C₂- oder C₃-Verlängerung, durch Verwendung üblicher C–C-Knüpfungsreaktionen wie Olefinierung vom Wittig-Typ, Allylierung oder Vinylierung, umgesetzt werden.^[71] Ausgehend von α -Hydroxysäuren können durch Verlängerung des Kohlenstoffgerüsts ebenfalls Desoxyzucker erhalten werden. In seltenen Fällen wurden außer Aminosäuren und α -Hydroxysäuren andere natürlich vorkommende, chirale Bausteine zur Synthese von Desoxyzuckern verwendet. Typische Beispiele sind der Einsatz von Parasorbinsäure^[86-88] und Argentilacton^[89]. Die Synthese der 2,3,6-Tridesoxyhexose L-Rhodosinose (**33**) ist in Schema 15 exemplarisch ausgehend von D-Threonin (**38**) gezeigt. Der Schlüsselschritt zum Aufbau des Zuckergerüsts erfolgt hier über eine Wittig-Olefinierung.^[90]



Schema 15. Synthese von L-Rhodosinose (**33**) ausgehend von D-Threonin (**38**).^[90]

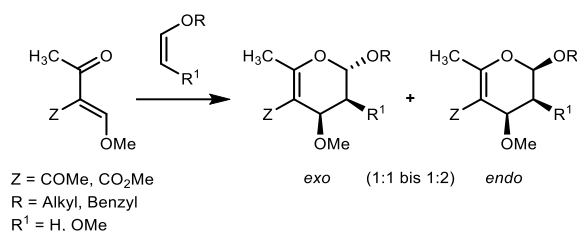
Ausgehend von prochiralen Startmaterialien, insbesondere Alkenen, sind einige enantioselektive, katalytische Oxidationen bekannt, um Desoxyzucker herzustellen. Besonders die Epoxidierung nach SHARPLESS und asymmetrische Dihydroxylierungen stellen hier potente Methoden dar. D-Digitoxose (**45**) kann ausgehend von monobenzylierten *meso*- oder D/L-Divinylglykolen hergestellt werden (Schema 16).^[91] Der Schlüsselschritt ist hier die Überführung des Diens **42** in D- oder L-*ribo*-Monoepoxyhexendiol. Nach regioselektiver reduktiver Epoxidöffnung zum Diol **43** und Hydroborierung der verbliebenen Alkenyldoppelbindung und selektiver Oxidation wird der Aldehyd **44** erhalten, welcher durch Abspaltung der Schutzgruppen die 2,6-Didesoxyhexose **45** liefert.



Schema 16. Synthese von D-Digitoxose (**45**).^[91]

Cycloadditionsstrategien sind mit die häufigsten Methoden zum Aufbau von Desoxyzuckern aus Nicht-Kohlenhydraten. Der Schlüsselschritt erlaubt die Ausbildung von bis zu zwei neuen Stereozentren. Da dieser

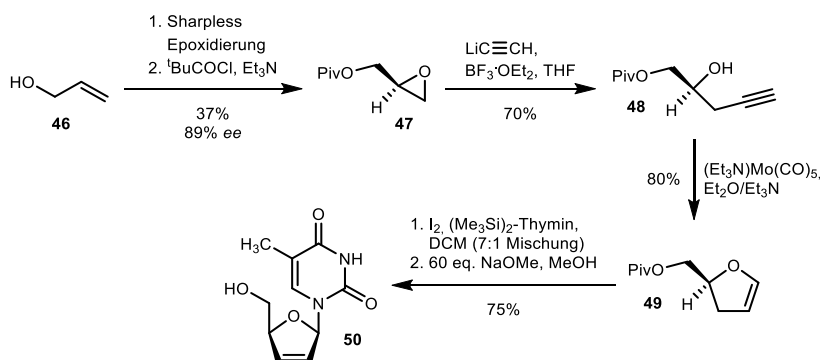
Reaktionsschritt in der Regel konzertiert verläuft, ist so ein hoher Grad an Stereoselektivität gewährleistet. Durch die Grenzorbitaltheorie können zudem vorab Aussagen auf die Stereopräferenz getroffen werden. Gerade bei der Diels-Alder-Reaktion ([4 + 2]-Cycloaddition) werden zwei neue C–C-Bindungen mit einem hohen Grad an Regio- und Stereoselektivität gebildet.^[92] Weiterhin sind Beispiele bekannt, bei denen sowohl [2 + 2]-^[93-94] als auch [3 + 2]-Cycloadditionen^[71,95-96] genutzt wurden, um Desoxyzucker zu generieren. SCHMIDT *et al.* etablierten eine der ersten Synthesen von Desoxyzuckervorläufern durch eine [4 + 2]-Cycloaddition (Schema 17). In der inversen Diels-Alder-Reaktion der Diene (Z = COMe, CO₂Me; R = Alkyl, Benzyl; R¹ = H, OMe) mit Enolethern (R¹ = H) und Endiolethern (R¹ = OMe) können so effizient 3,4-Dihydro-2H-pyranen erhalten werden, welche synthetische Vorläufer zu 6-Desoxy- (R¹ = OMe) und 2,6-Didesoxyzuckern (R¹ = H) sind.^[97-98]



Schema 17. [4 + 2]-Cycloaddition nach SCHMIDT zur Synthese von 3,4-Dihydro-2H-pyranen als Vorläufer von 6-Desoxy- (R¹ = OMe) und 2,6-Didesoxyzuckern (R¹ = H).^[97-98]

Einige Methoden der Organometallchemie haben ebenfalls Einzug in das Feld der Desoxyzuckersynthese gefunden. Organometallische Reagenzien und übergangsmetallbasierte Katalysatoren erlauben den Aufbau heterozyklischer Systeme, welche üblicherweise nicht durch „klassische“ chemische Reaktionen erhalten werden können. Die Methoden bestechen oft durch hohe Ausbeuten, eine gute Chemoselektivität und im Fall von enantioselektiven Reaktionen eine ausgezeichnete Flexibilität in Bezug auf Substrat- und Stereokontrolle, wobei beide Enantiomere in der Regel ähnlich gut zugänglich sind. Besonders hervorzuheben in der übergangsmetallkatalysierten Synthese von Desoxyzuckern sind die Ringschlussmetathese^[99-100] und Zyklisierungen mit Metall-Carbenoid-Komplexen^[101].

Ein besonders elegantes Beispiel zur Anwendung von Übergangskomplexen für die Synthese von Desoxyzuckern stammt von McDONALD *et al.*, die eine Vorstufe des Anti-AIDS Wirkstoffs Stavudin (4-Desoxythymidin, **50**) herstellten (Schema 18).^[102-103]



Schema 18. Synthese von Stavudin (**50**).^[101-102]

Der Schlüsselschritt erfolgte dabei durch Molybdänpentacarbonyl-katalysierte Zyklisierung von Alkynylcarbinol **48**.^[101] Letzteres lässt sich in enantiomerangereicherter Form (89% ee) ausgehend von Allylalkohol (**46**) durch asymmetrische Sharplessepoxydierung und anschließender Umsetzung zum

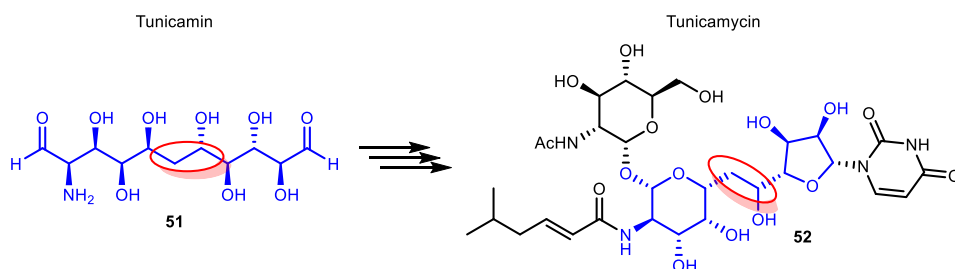
Pivaloatester **47** herstellen. Die Zugabe von Lithiumacetylid-Bortrifluoridetherat führte zur regioselektiven Ausbildung des Homopropargylalkohols **48**. Durch Umsetzen mit katalytischen Mengen von Molybdänpentacarbonyl und Trimethylamin-*N*-oxid wurde das Dihydrofuran **49** erhalten. Es folgte eine durch Jod induzierte Addition von *N*-silyliertem Thymin an die Enoether-Doppelbindung, gefolgt von einer gleichzeitigen Eliminierung und Methanolyse, um freies Stavudin (**50**) zu erhalten.

Biotransformationen gewinnen in der organischen Synthese zunehmend an Bedeutung.^[104-105] Es sind einige Totalsynthesen von Desoxyzuckern bekannt, in denen Enzyme in Teilschritten zum Einsatz kommen. Die bis dato verwendeten Enzyme sind nicht an der Biosynthese von Desoxyzuckern beteiligt. Eine Ursache liegt mitunter darin, dass die Enzyme, welche an sekundären Stoffwechselwege beteiligt sind, weniger gut verfügbar sind.^[106] Als Alternative wurde nach Enzymen gesucht, die am klassischen Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt sind, aber eine geringe Substratspezifität aufweisen. Aldolasen und Transketolasen sind in der Lage, natürlich vorkommende sowie modifizierte Desoxyzucker zu erzeugen.^[107] Speziell die enzymatische Synthese von Desoxyzuckern ist durch DHAP- (FruA, FucA, TagA und RhuA; Kapitel 1.2.4), DHA- (FSA; Kapitel 1.2.5) und AA- (DERA; Kapitel 1.2.6) abhängige Aldolasen möglich, wobei das Zuckergerüst über eine Aldolreaktion ausgehend von achiralen Molekülen aufgebaut werden kann.

1.4 Bidirektionale C–C-Bindungsknüpfung mit Enzymen an Dialdehyden („Tandem“-Aldolreaktionen)

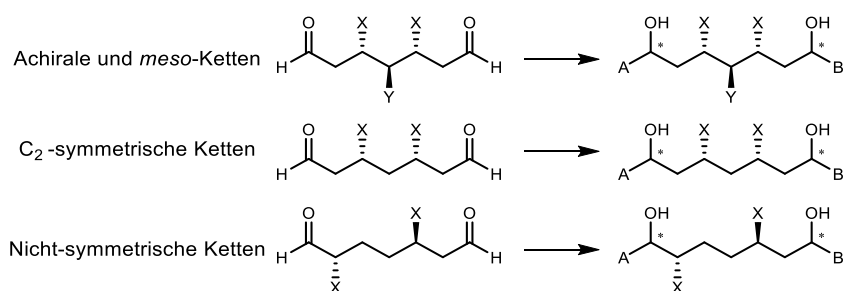
Glutardialdehyd ist zwar als aktiver Proteinquervernetzer (engl. *cross-linker*) bekannt, es wurden jedoch bereits länger-kettige Dialdehyde erfolgreich in Aldoladditionen eingesetzt, wobei meist nur Einfachadditionen beobachtet wurden.^[108] Nichtsdestotrotz sind Dialdehyde prinzipiell in der Lage, an beiden elektrophilen Zentren unabhängig zu reagieren, was den Weg für bidirektionale Kettenverlängerungen öffnet, ohne dass Intermediate mühsam isoliert werden müssen.^[109] Wenn das Substrat zudem an den passenden Stellen mit Hydroxygruppen versehen ist, können so C-glykosidisch verknüpfte Kohlenhydrate erhalten werden, welche als Disaccharidmimetika verwendet werden können.^[110] Die Synthese länger-kettiger Kohlenhydrate, insbesondere C-Glycoside, lässt sich in zwei Kategorien einteilen: In eine iterative Kettenverlängerung einer Aldose am Carbonylkohlenstoff, wobei jedes Stereozentrum selektiv aufgebaut werden muss, oder eine direkte Verknüpfung zweier Zuckerbausteine.^[111] Beide Ansätze weisen ihre Grenzen in der chemischen Synthese auf, da eine freie Carbonylgruppe nötig ist, die jedoch wegen thermodynamisch bevorzugter intramolekularer Zyklisierung in der ringgeschlossenen Form maskiert vorliegt. Letzteres erfordert eine Schutzgruppenstrategie und andererseits sind Katalysatoren nötig, die relativ polare Substrate umsetzen können. Eine weitere Möglichkeit stellt die Synthese ausgehend von einfachen, teils symmetrischen Dialdehyden dar. Bei klassisch-chemischen Reaktionen zeigen sich die Schwierigkeiten, dass sowohl eine relativ hohe Stereokontrolle als auch eine Differenzierung der funktionellen Gruppen nötig ist. Eine Lösung besteht im Einsatz von stereoselektiven Biokatalysatoren für asymmetrische C–C-Bindungsknüpfungen. Prinzipiell lassen sich bifunktionale Aldehyde in Eintopfreaktionen einsetzen, wobei der Aldoldonor sequenziell an die Akzeptorcarbonylverbindung addiert wird, ohne dass Zwischenprodukte isoliert werden müssen. Derartige Prozesse werden auch als „Tandemreaktionen“ definiert. Abhängig von der Spezifität des eingesetzten Enzyms und der Anzahl sowie Position der Hydroxygruppen im Ausgangsmaterial sollten die isomere Konstitution sowie die absolute und relative Stereochemie kontrollierbar sein. Die bidirektionale Synthesestrategie bietet den Vorteil, die Anzahl synthetischer Transformationen klein zu halten. Folglich sollte es möglich sein, größere Kohlenhydratmoleküle

über solche Tandem-Aldolreaktionen aufzubauen. Beispiele aus der Natur können hier als Inspiration dienen. Aus der Dialdehydgrundstruktur von Tunicamin (**51**) kann das Nukleosid-Antibiotikum Tunicamycin (**52**) gebildet werden (Schema 19), bei dem eine Pyranose und eine Furanose jeweils C-glycosidisch über eine Kohlenstoffbrücke miteinander verknüpft sind.



Schema 19. Beispiel für die Umwandlung des Dialdehydes Tunicamin zum Nukleosid Antibiotikum Tunicamycin in der Natur. Blau: Dialdehyd Grundgerüst. Rot: C-Glycosidisch verknüpfte Brücke zwischen beiden Zuckerbausteinen.

Prinzipiell gibt es verschiedene Strategien zur Synthese von azyklischen Ketten. Ein Merkmal, das die sequenzielle bidirektionale Synthese gegenüber linearen Synthesen hervorhebt, ist, dass sie intrinsisch effizienter ist, da sowohl die Anzahl an Reaktionsschritten verringert wird, als auch ein hohes Maß an Enantiomeren-Reinheit der Zielverbindung gewährleistet werden kann. Es existieren drei prinzipielle Ansätze zum bidirektionalen Aufbau von Ketten.^[112] Achirale bzw. *meso*-Ketten und C_2 -symmetrische Ketten haben die Gemeinsamkeit, dass symmetrische Zielprodukte erhalten werden können. Bei nicht-symmetrischen Ketten sind die Zielprodukte gezwungenermaßen unsymmetrisch, als Beispiel sei hier erneut Tunicamin aufgeführt.



Schema 20. Möglichkeiten einer bidirektionalen Kettenverlängerung am Beispiel von Dialdehyden.^[109]

Bidirektionale Synthesen ausgehend von Dialdehyden mit DHAP-abhängigen Aldolasen, basierend auf dem obigen Konzept, sind bereits ausführlich untersucht worden.^[109-110,113] Aufgrund der verhältnismäßig einfachen Verfügbarkeit dieser Katalysatoren wurde die Voraussetzung für eine kombinatorische Biokatalyse geschaffen, bei der gezielt chirale Aldoladdukte durch einfache Wahl des geeigneten Enzyms sowie Ausgangsmaterials hergestellt wurden. Wie bereits beschrieben (Kapitel 1.2.4), steht hier jedoch der nötige Einsatz von DHAP einer breiten Anwendung entgegen.

1.5 Stand der Forschung – D-Fructose-6-phosphat-Aldolase

Die Verwendung der FSA für präparative Synthesen befindet sich bisher noch in einem explorativen Stadium. Grundlegend gibt es zwei Ansätze zur Entwicklung der FSA als Katalysator: Da die FSA ähnlich wie andere Aldolasen ein breites Spektrum an Aldolakzeptoren annimmt, beziehen sich folglich die meisten Untersuchungen zunächst auf die Aldolakzeptorpromiskuität. Erst später dazu gab es Versuche zur Erweiterung des Aldoldonorspektrums. Erste syntheseorientierte Arbeiten mit der FSA wurden 2006 von CASTILLO *et al.*

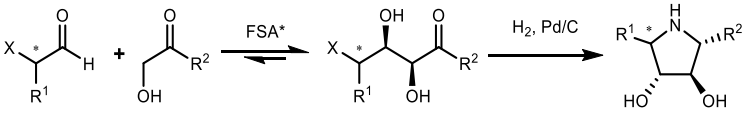
berichtet, wobei die Nutzbarkeit von Aminoaldehyden für die potentielle Synthese von Iminocyclitolen im Fokus stand.^[43] Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden über die Jahre immer komplexere Aminosucker realisiert.^[45,48,114-117] Analog dazu wurde versucht, einfache polare sowie apolare aliphatische Aldehyde umzusetzen.^[44-45,47,114,118-124] Vor kurzem wurden auch aromatische Aldehyde in FSA-katalysierten Reaktionen getestet, wobei diese Studien sich auf reine Reaktionsscreenings beschränken.^[125-126] In Bezug auf das Donorspektrum beschäftigten sich Arbeiten einerseits mit längerkettigen Aldoldonoren^[127] und andererseits mit (zyklo-)aliphatischen Donoren^[128-131]. Im Nachfolgenden sind die bisher veröffentlichten Ergebnisse zum Reaktionsspektrum der FSA und deren Varianten tabellarisch zusammengefasst. Zuerst werden Ergebnisse mit verschiedenen Aldolakzeptoren diskutiert, wobei hier eine Gliederung in Aminoaldehyde (Kapitel 1.5.1.1), aliphatische Aldehyde (Kapitel 1.5.1.2) und aromatische Aldehyde (Kapitel 1.5.1.3) erfolgt. Danach wird kurz auf die Entwicklung von FSA-Varianten eingegangen, welche längerkettige (Kapitel 1.5.2.1) sowie aliphatische (Kapitel 1.5.2.2) Aldoldonoren umsetzen können.

1.5.1 Einsatz von FSA in der Synthese – Aldolakzeptoren

1.5.1.1 Aminoaldehyde

Aminoaldehyde lassen sich nicht direkt in Aldolreaktionen einsetzen, da diese intermolekular miteinander unter Iminbildung reagieren, sodass die Aldehydgruppe nicht mehr zur Verfügung steht. Die Verwendung von Azido- oder *N*-Cbz-geschützten Aldehyden ermöglicht den Einsatz entsprechender Synthese-Äquivalente an Stelle von Aminoaldehyden. Durch reduktive Folgereaktionen der Aldolprodukte können so direkt die gesuchten Aminosucker erhalten werden. Reaktionen mit stickstoffsubstituierten Aldehyden in α -Position ergeben nach der Reduktion Aminosucker mit Pyrrolidingerüst (Tabelle 1).^[45,48,114]

Tabelle 1. Synthese von Aminosuckern mit Pyrrolidingerüst durch Aldoladdition von 1,3-Dihydroxyaceton, Hydroxyaceton und 1-Hydroxybutan-2-on an α -Stickstoff-enthaltende Aldehyde durch FSA-Varianten.^[45,48,114]

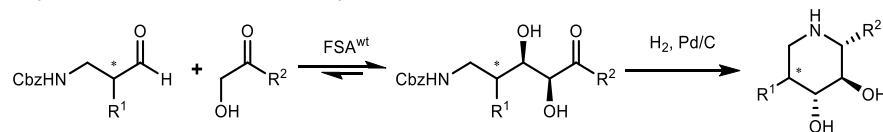


X	R ¹	R ²	Stereo ^a	FSA*	Ausbeute nach Addition [%]	Ausbeute nach Hydrierung [%]	Referenz
N ₃	H	CH ₂ OH	-	wt	- ^b	73	[48]
N ₃	H	Me	-	wt	- ^b	72	[48]
N ₃	H	Et	-	wt	- ^b	83	[48]
N ₃	CH ₂ NHAc	Me	<i>rac</i>	wt	- ^b	83	[48]
N ₃	CH ₂ NHAc	Et	<i>rac</i>	wt	- ^b	83	[48]
NHCbz	H	CH ₂ OH	-	wt	40	24	[45]
NHCbz	H	Me	-	wt	75	56	[45]
NHCbz	Me	CH ₂ OH	<i>S</i>	A129S/A165G	78	-	[114]
NHCbz	Me	Me	<i>S</i>	A129S/A165G	92	-	[114]
NHCbz	Me	CH ₂ OH	<i>R</i>	A129S/A165G	95	-	[114]
NHCbz	Me	Me	<i>R</i>	A129S/A165G	95	-	[114]

^aKonfiguration am α -Kohlenstoffatom des Aldehyds; ^bnicht isoliert.

Die Variante FSA^{A129S/A165G} weist im Vergleich zum Wildtyp eine höhere Toleranz gegenüber α -substituierten Cbz-geschützten Aminoaldehyden (z. B. $R^1 = \text{Me}$ (*S*- und *R*-Konfiguration); $R^2 = \text{CH}_2\text{OH}$, Me) auf.^[114] Durch Computerberechnungen konnte gezeigt werden, dass die A165G-Mutation genügend Raum schafft, um Methylgruppen in α -Position problemlos zu akzeptieren.^[114] Weiterhin können β -stickstoffsubstituierte Aldehyde erfolgreich umgesetzt werden, wobei durch anschließende Reduktion Aminosucker mit Piperidingerüst, häufig in eher moderaten Ausbeuten, erhalten werden (Tabelle 2).^[43,45,48]

Tabelle 2. Synthese von Aminosuckern mit Piperidingerüst durch Aldoladdition von 1,3-Dihydroxyaceton, Hydroxyaceton und 1-Hydroxybutan-2-on an β -Stickstoff-enthaltende Aldehyde durch FSA^{wt}.^[43,45,48]

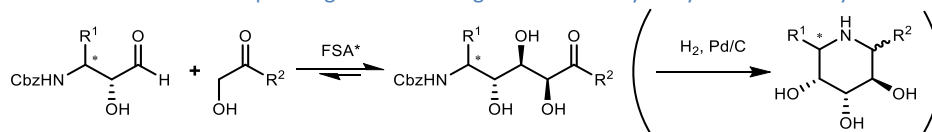


R^1	R^2	Stereo ^a	Ausbeute nach Addition [%]	Ausbeute nach Hydrierung [%]	Referenz
H	CH ₂ OH	-	69	51	[43]
H	Me	-	_b	78	[48]
H	Et	-	_b	78	[48]
OH	CH ₂ OH	<i>R</i>	_b	14	[45]
OH	Me	<i>R</i>	_b	48	[48]
OH	Et	<i>R</i>	_b	51	[48]
OH	CH ₂ OH	<i>S</i>	_b	49	[45]
OH	Me	<i>S</i>	_b	60	[48]
OH	Et	<i>S</i>	_b	57	[48]

^aKonfiguration am α -Kohlenstoffatom des Aldehyds; ^bnicht isoliert.

Analog konnten Cbz-geschützte 2-Hydroxy-3-aminoaldehyde erfolgreich umgesetzt werden, wobei 3,4,5-trihydroxylierte Piperidine erhalten werden (Tabelle 3).^[116]

Tabelle 3. Synthese von Aminosuckern mit Piperidingerüst aus Cbz-geschützten 2-Hydroxy-3-aminoaldehyden durch FSA-Varianten.^[116]



R^1	R^2	Stereo ^a	FSA*	Ausbeute [%]
CH ₂ OH	CH ₂ OH	<i>S</i>	A129S/A165G	19
CH ₂ OH	Me	<i>S</i>	wt	47
CH ₂ OH	H	<i>S</i>	A129G	43
CO ₂ H	CH ₂ OH	<i>S</i>	A129S	65
CO ₂ H	Me	<i>S</i>	wt	69
CO ₂ H	H	<i>S</i>	A129G	79
CO ₂ H	CH ₂ OH	<i>R</i>	A129S	80
CO ₂ H	Me	<i>R</i>	wt	89
CO ₂ H	H	<i>R</i>	A129G	43

^aKonfiguration am α -Kohlenstoffatom des Aldehyds.

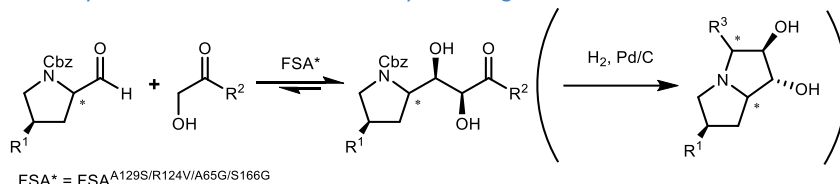
Basierend auf den obigen Ergebnissen wurden länger-kettige Aminoaldehyde getestet. Da Versuche mit FSA^{wt} jedoch nicht zu ausreichend hohen Umsätzen führten, wurden FSA-Varianten entwickelt, welche in der Lage sind, Aldehyde bis zu einer Kettenlänge von fünf Kohlenstoffatomen umzusetzen, wobei erneut Pyrrolidin- bzw. Piperidinstrukturen erhalten werden können. Auffällig bei diesen Synthesen ist, dass allgemein relativ gute Umsätze zu beobachten sind, die Ausbeuten der isolierten Verbindungen teils jedoch deutlich niedriger ausfallen.^[115] SOLER *et al.* berichteten, dass NMR-spektroskopisch hauptsächlich *syn*-Produkte mit >95:5 *dr* bzw. 98% *de* nachgewiesen werden konnten, was für eine Diastereoselektivität der FSA-Varianten spricht.^[115]

Tabelle 4. Synthese von Aminosukzern durch FSA-Varianten.^[115]

R ¹	R ²	Stereo	n	FSA ^{*a} (X)	Umsatz [%]	Ausbeute [%]
Et	CH ₂ OH	<i>R</i>	0	A (X = R)	97	42
Et	Me	<i>R</i>	0	A (X = R)	96	52
Et	H	<i>R</i>	0	B (X = S)	83	56
Et	CH ₂ OH	<i>S</i>	0	A (X = S)	86	15
Et	Me	<i>S</i>	0	A (X = R)	76	30
Et	H	<i>S</i>	0	B (X = S)	80	65
ⁿ Pr	CH ₂ OH	<i>R</i>	0	A (X = V)	80	11
ⁿ Pr	Me	<i>R</i>	0	A (X = R)	95	14
ⁿ Pr	H	<i>R</i>	0	B (X = V)	70	42
ⁿ Pr	CH ₂ OH	<i>S</i>	0	A (X = V)	18	3
ⁿ Pr	Me	<i>S</i>	0	A (X = P)	87	28
ⁿ Pr	H	<i>S</i>	0	B (X = P)	52	23
ⁱ Pr	Me	<i>R</i>	0	A (X = V)	90	28
ⁱ Pr	Me	<i>S</i>	0	A (X = P)	84	34
ⁱ Pr	H	<i>R</i>	0	B (X = V)	63	33
ⁱ Pr	H	<i>S</i>	0	B (X = P)	29	18
ⁱ Pr	H	<i>S</i>	0	B (X = V)	25	22
ⁱ Bu	Me	<i>R</i>	0	A (X = P)	70	33
ⁱ Bu	H	<i>R</i>	0	B (X = V)	30	7
	Me	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>	0	A (X = V)	67	19
	Me	2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>	0	A (X = S)	70	23
CO ₂ H	CH ₂ OH	<i>S</i>	1	A (X = R)	70	45
CO ₂ H	H	<i>S</i>	1	B (X = P)	90	27

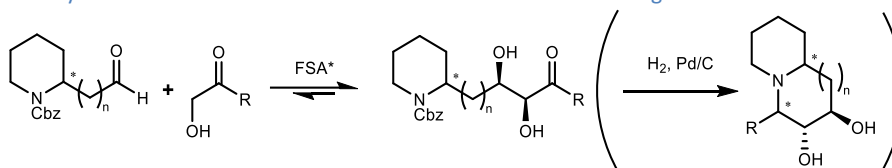
^aA: A129S/R134X/A165G/S166G; B: L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G.

Ebenfalls wurden einige zyklische Aminoaldehyde basierend auf Pyrrolidinen getestet, wobei hier Pyrrolizidinstrukturen ermöglicht werden (Tabelle 5). Trotz hoher Umsätze sind hier ebenfalls verminderte Ausbeuten zu beobachten.^[115]

Tabelle 5. Synthese von Aminosuktern mit Pyrrolizidingerüst durch FSA^{A129S/R124V/A65G/S166G} [115]

R ¹	R ²	Stereo	Umsatz [%]	Ausbeute [%]
H	CH ₂ OH	S	90	33
H	Me	S	90	56
(4R)-OH	Me	S	90	44

Analog können auch Aminoaldehyde basierend auf Piperidinen eingesetzt werden. Je nach Anzahl *n* der Methylengruppen zwischen Aldehyd und dem Piperidinring können so nach reduktiver Aufarbeitung Indolizidine (*n* = 0) oder Chinolizidine (*n* = 1) erhalten werden (Tabelle 6).^[115]

Tabelle 6. Synthese von Aminosuktern mit Chinolizidin- oder Indolizidingerüst durch FSA-Varianten.^[115]

R	Stereo	<i>n</i>	FSA*	Umsatz [%]	Ausbeute [%]
CH ₂ OH	S	0	A ^a (X = V)	90	18
Me	S	0	A ^a (X = V)	90	41
Me	R	0	A ^a (X = V)	14	k.A. ^c
Me	±	1	A ^a (X = P)	49	k.A. ^c
H	S	0	B ^b (X = V)	20	8
H	±	1	B ^b (X = P)	24	k.A. ^c
H	±	1	B ^b (X = P)	44	k.A. ^c

^aA: A129S/R134X/A165G/S166G; ^bB: L107Y/A129G/R134X/A165G/S166G; ^ckeine Angabe; Folgeprodukt aus reduktiver Aminierung mittels NMR nachgewiesen.

1.5.1.2 Aliphatische Aldehyde

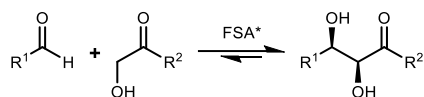
Bisher wurde bereits eine relativ große Anzahl an aliphatischen Aldehyden mit einer breiten Varianz an Seitenketten als Aldolakzeptoren eingesetzt. Bei diesen Reaktionen wurde eine Fülle an strukturell unterschiedlichen Verbindungen wie Kohlenhydrate, Desoxyzucker, Zuckerphosphatanaloga und polyhydroxylierte Moleküle erhalten, wobei stets ein hoher Grad an Stereoselektivität zu beobachten war (Tabelle 7).^[45,47,114,118-123] Eine gute Donorqualität kann in einigen Fällen dazu führen, dass der Umsatz eines schwachen Akzeptoraldehyds erhöht wird. Für den Wildtyp der FSA gliedert sich die Donorsubstrat-Qualität nach HA > HB > DHA. Wie erwähnt weist die Variante FSA^{A129S} eine erhöhte Effizienz gegenüber DHA auf, sodass hier die veränderte Präferenz DHA > HA > HB zu beobachten ist.^[47] Ein Beispiel für den Einfluss der Donorqualität ist D-Threose (R¹ = (2S,3R)-(CH(OH)CH(OH)CH₂OH)), welche ein Produkt mit Hydroxyaceton durch FSA^{wt} bildet, wohingegen keine Produktbildung bei 1,3-Dihydroxyaceton zu beobachten ist.

Tabelle 7. FSA*-katalysierte Reaktionen mit strukturell einfachen Aldehyden.^[45,47,114,118-123,132]

$$\text{R}^1\text{-CHO} + \text{R}^2\text{-CO-CH}_2\text{OH} \xrightarrow{\text{FSA}^*} \text{R}^1\text{-CH(OH)-CH(OH)-CO-R}^2$$

R ¹	R ²	FSA*	Umsatz [%]	Ausbeute [%]	Referenz
H	Me	wt	- ^a	95	[118]
H	CH ₂ OH	A129S	- ^a	68	[47]
Me	CH ₂ OH	A129S	- ^a	71	[119]
Et	Me	wt	>75 ^b	~70	[120]
Et	CH ₂ OH	wt	~50 ^b	~40	[120]
Et	Et	wt	~50 ^b	~35	[120]
ⁿ Pr	Me	wt	- ^a	90	[118]
ⁱ Bu	CH ₂ OH	A129S	- ^a	77	[119]
Bn	Me	wt	77	46	[45]
Bn	CH ₂ OH	wt	70	48	[45]
CH ₂ Cl	CH ₂ OH	wt	- ^a	84	[121]
CH ₂ Br	CH ₂ OH	wt	- ^a	84	[121]
CH ₂ OH	Me	wt	>75 ^b	~80	[120]
CH ₂ OH	CH ₂ OH	wt	<25 ^b	- ^a	[120]
CH ₂ OH	CH ₂ OH	A129S	80	42	[47]
CH ₂ OH	Et	wt	~50 ^b	~40	[120]
CH ₂ OBn	CH ₂ OH	wt	35	28	[45]
CH ₂ OBn	CH ₂ OH	A129S/A165G	98	60	[114]
CH ₂ OBn	Me	wt	95	71	[45]
CH ₂ OPO ₃ ²⁻	Me	wt	- ^a	85	[122]
CH ₂ OPO ₃ ²⁻	CH ₂ OH	A129S	- ^a	89	[122]
CH ₂ OPO ₃ ²⁻	Et	wt	- ^a	77	[122]
CH ₂ CH(OMe) ₂	Me	wt	- ^a	98	[118]
	CH ₂ OH	A129S	- ^a	55	[119]
	Me	wt	>75 ^b	~70	[120]
	CH ₂ OH	wt	<25 ^b	quant.	[120]
	Et	wt	~50 ^b	~75	[120]
(CH ₂) ₂ OH	Me	wt	>75 ^b	quant.	[120]
(CH ₂) ₂ OH	CH ₂ OH	wt	~50 ^b	quant.	[120]
(CH ₂) ₂ OH	Et	wt	>75 ^b	quant.	[120]
(CH ₂) ₂ SMe	CH ₂ OH	A129S	- ^a	67	[119]
C(CH ₃) ₂ OH	Me	wt	~50 ^b	~60	[120]
C(CH ₃) ₂ OH	CH ₂ OH	wt	<25 ^b	~50	[120]
C(CH ₃) ₂ OH	Et	wt	~50 ^b	~50	[120]

Tabelle 7. (fortgesetzt)



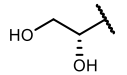
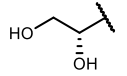
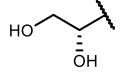
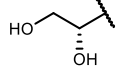
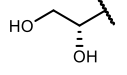
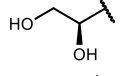
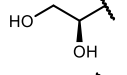
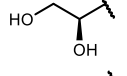
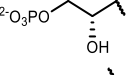
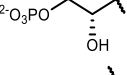
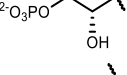
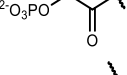
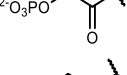
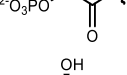
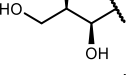
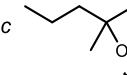
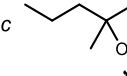
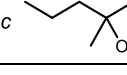
R ¹	R ²	FSA*	Umsatz [%]	Ausbeute [%]	Referenz
	Me	A129S	86	68	[47]
	CH ₂ OH	A129S	81	67	[47]
	Me	wt	>75 ^b	~75	[120]
	CH ₂ OH	wt	<25 ^b	– ^a	[120]
	Et	wt	>75 ^b	~80	[120]
	Me	wt	>75 ^b	~80	[120]
	CH ₂ OH	wt	<25 ^b	– ^a	[120]
	Et	wt	>75 ^b	~80	[120]
	Me	wt	– ^a	95	[123]
	CH ₂ OH	A129S	– ^a	80	[123]
	Et	wt	– ^a	94	[123]
	Me	wt	– ^a	45	[132]
	CH ₂ OH	A129S	– ^a	50	[132]
	Et	wt	– ^a	54	[132]
	Me	wt	– ^a	58	[45]
<i>rac</i> 	Me	wt	<25 ^b	– ^a	[120]
<i>rac</i> 	CH ₂ OH	wt	~50 ^b	– ^a	[120]
<i>rac</i> 	Et	wt	~50 ^b	– ^a	[120]

Tabelle 7. (fortgesetzt)

R ¹	R ²	FSA*	Umsatz [%]	Ausbeute [%]	Referenz
	Me	wt	- ^a	77	[122]
	CH ₂ OH	A129S	- ^a	90	[122]
	Et	wt	- ^a	79	[122]

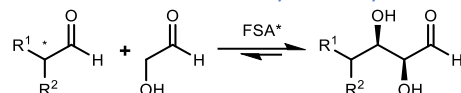
^anicht bestimmt/angegeben; ^bder Reaktionsumsatz wurde Dünnschichtchromatographisch bestimmt. Umsätze mit ~50% sind hier als gemittelte Werte angegeben, da diese in der Literatur zwischen 25 und 75% abgeschätzt wurden.

Werden 4-Nitroaldehyde unter Katalyse von FSA^{A129S} umgesetzt, dann kann bei den gebildeten Aldolprodukten unter den Reaktionsbedingungen spontan eine intramolekulare Henry-Reaktion eintreten, womit Nitrocyclitole erhalten werden (Tabelle 8).^[47] Der Zyklisierungsschritt verläuft hierbei jedoch nicht stereoselektiv. Durch Reduktion der Nitrogruppe sind so prinzipiell Aminocyclitole zugänglich.

Tabelle 8. FSA^{A129S}-katalysierte Reaktionen mit Nitroaldehyden mit intramolekularer Henry-Reaktion zu Nitrocyclitolen.^[47]

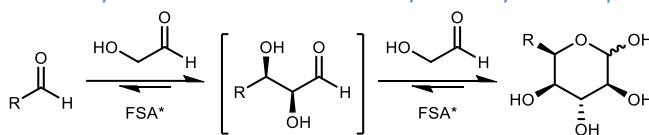
R ¹	R ²	Produkt(e)	Ausbeute [%]
H	CH ₂ OH		73
H	Me		87
(R)-OH	CH ₂ OH		52

FSA kann auch 2-Hydroxyacetaldehyd (Glykolaldehyd, GO) als nukleophile Donorkomponente verwenden. Wird GO als Donor mit anderen Aldehyden als Akzeptoren umgesetzt, besteht eine Konkurrenz aus Selbst- und Kreuzaldoladdition. Das Verhältnis zwischen beiden Reaktionen hängt stark von der Qualität des Akzeptors ab. Wenn die Konzentration an GO in der Reaktionslösung gering gehalten wird, beispielsweise durch langsame Zugabe über eine Spritzenpumpe, kann die Selbstaldoladdition soweit unterdrückt werden, dass das gewünschte Kreuzaldolprodukt in ausreichenden Mengen erhalten werden kann (Tabelle 9).^[44,123-124] Das Gleichgewicht der Reaktion kann zudem durch Ausbildung zyklischer Halbacetale oder Halbaminale auf die Seite der Kreuzaldolprodukte verschoben werden.

Tabelle 9. FSA*-katalysierte Einfachaddition von Glykolaldehyd an Akzeptoraldehyd.^[44,123-124]

R ¹	R ²	FSA*	Stereo	Ausbeute [%]	Referenz
H	OH	wt	-	67	[44]
Me	OH	wt	<i>S</i>	50	[44]
CH ₂ NHCbz	H	wt	-	50	[44]
CH ₂ NHCbz	OH	wt	<i>rac</i>	68	[44]
CH ₂ OBn	OH	wt	<i>rac</i>	65	[44]
CH ₂ OPO ₃ ²⁻	OH	wt	<i>R</i>	87	[123]
(CH ₂) ₂ OH	H	L107Y/A129G	-	43	[124]

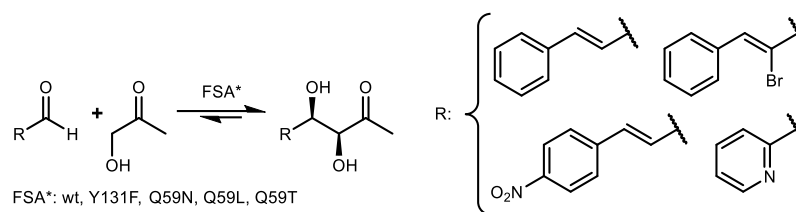
Da bei der Addition von GO ein Produkt mit einer neuen Aldehydfunktionalität entsteht, kann prinzipiell ein zweites Molekül GO addiert werden. Anhand von modifizierten FSA-Varianten konnte eine Zweifachaddition in Form einer Tandemreaktion beobachtet werden, wobei die Reaktionen mit befriedigenden bis ausgezeichneten Umsätzen stattfanden (Tabelle 10).^[124] Analog zu anderen FSA-katalysierten Reaktionen sind die Ausbeuten teils deutlich niedriger als die beobachteten Reaktionsumsätze.

Tabelle 10. FSA*-katalysierte Zweifachaddition von Glykolaldehyd an Akzeptoraldehyd.^[124]

R ¹	FSA*	Umsatz [%]	Ausbeute [%]
H	A129T/A165G	85	48
Me	A129T/A165G	98	62
CH ₂ OH	A129T/A165G/S166G	70	7
CH ₂ OMe	A129T/A165G/S166G	79	39
CH ₂ OBn	A129T/A165G/S166G	94	46
CH ₂ SBn	A129T/S166G	80	39
CH ₂ OPh	A129T/S166G	65	43
CH ₂ N ₃	A129T/S166G	80	62
CH ₂ Cl	A129T/S166G	67	11
Et	A129T/S166G	51	31
(CH ₂) ₂ Ph	A129T/S166G	58	47

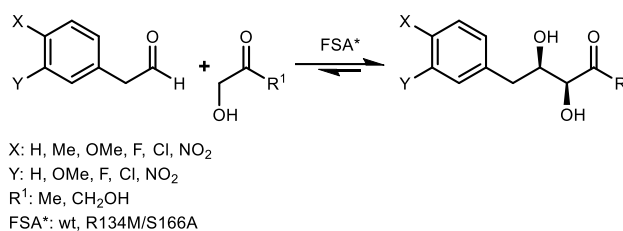
1.5.1.3 Aromatische Aldehyde

2017 wurden aromatische Aldehyde in FSA-katalysierten Reaktionen als Substrate kaum untersucht, als YANG *et al.* zeigten, dass Zimtaldehydderivate und 2-Formylpyridin als mögliche Substrate in Frage kommen können.^[126] Über das Stadium des Screenings sind diese Versuche jedoch nicht hinausgegangen, sodass noch präparativ nachgewiesen werden muss, dass einerseits der Einsatz von aromatischen Aldehyden möglich ist und andererseits wie zuverlässig FSA^{wt} und deren Varianten im Hinblick auf Reaktionsausbeuten und Stereoselektivität sind.



Schema 21. Auf Aldolaseaktivität getestete Zimtaldehyde und 2-Formylpyridin mit FSA-Varianten.^[126]

MA *et al.* berichteten zudem von 3,4-substituierten Phenylacetaldehyden, welche durch FSA^{wt} und der Variante FSA^{R134M/S166A} umgesetzt werden können.^[125] Der präparative Wert aromatischer Substrate muss hier jedoch ebenfalls noch durch Synthesen bestätigt werden, um ein qualitatives Urteil fällen zu können.



Schema 22. Auf Aldolaseaktivität getestete 3,4-substituierte Phenylacetaldehyde mit FSA^{wt} und FSA^{R134M/S166A}.^[125]

1.5.2 Einsatz von FSA in der Synthese – Aldoldonoren

1.5.2.1 Kettenverlängerte Aldoldonoren

Dass die FSA relativ tolerant gegenüber einer Großzahl an Akzeptormolekülen ist, wurde durch Reaktionen verschiedenster Aldolakzeptoren gezeigt. Erste Ergebnisse in Bezug auf eine breiter anwendbare Erweiterung des Donorspektrums sind hingegen erst 2016 veröffentlicht worden. Nach Güclü *et al.* konnten durch Mutation von Leucin jeweils in Position 107 und 163 zu Alanin ausreichend Platz für Donormoleküle mit Kettenlängen von bis zu sieben Atomen geschaffen werden.^[127] Bisher wurde nur 3-Hydroxypropanal modellhaft als Akzeptormolekül getestet, sodass die mögliche Kombination aus Varianten, die größere Akzeptoren sowie Donoren miteinander umsetzen können, erst noch gezeigt werden muss.

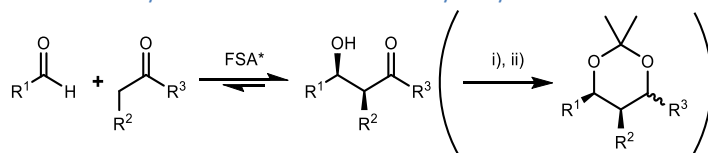
Tabelle 11. Umsetzung von Aldoldonoren mit Kettenlängen bis C7 mit 3-Hydroxypropanal.^[127]

R	Ausbeute [%]	R	Ausbeute [%]
Me	87	^t Bu	n.b. ^a
Et	89	^{neo} Pent	25
ⁿ Pr	75	OMe	89
ⁿ Bu	76	OEt	82
ⁿ Pent	50	O ⁿ Pr	28
ⁱ Bu	28	O ⁱ Pr	30
ⁱ Pent	28	OAllyl	45

^aNicht bestimmt.

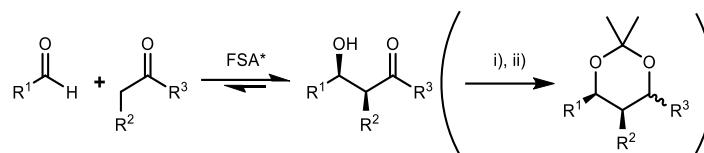
1.5.2.2 Aliphatische, nicht-hydroxylierte Aldoldonoren

ROLDÁN *et al.* zeigten 2017, dass FSA-Varianten mit einer Änderung von Asparaginsäure in Position 6 in der Lage sind, aliphatische Donoren wie Aceton oder Propanal, sowie zykoaliphatische Donoren wie Cyclobutanon oder Cyclopentanon, in teils sehr guten Ausbeuten umzusetzen (Tabelle 12).^[128-130,133] Diese Arbeiten zeigen, dass die Beschränkung enzymatischer Synthesen auf rein polare Donorsubstrate wie Zuckerderivate und Aminocyclitole erfolgreich durchbrochen werden kann. JUNKER *et al.* zeigten, dass Homoaldolkupplungen zwischen aliphatischen, nicht-hydroxylierten Aldehyden, gezeigt am Beispiel von Propionaldehyd, möglich sind.^[133] Bemerkenswerterweise zeigen die modifizierten FSA-Varianten keine native Aktivität mehr.^[130] In Anbetracht des möglichen Substratspektrums eröffnen sich viele Möglichkeiten in Bezug auf eine Anwendung in industriellen Prozessen, da aliphatische, unsymmetrische Moleküle meist leichter verfügbar und kostengünstiger sind. Wie am Beispiel von 3-Hydroxybutanal gezeigt, ermöglicht die Kombination aus 3-Hydroxyaldehydakzeptor und aliphatischen Aldehyd- oder Ketondonor die Synthese von Desoxyzuckern. Die gebildeten 5-Hydroxyketone sind prinzipiell in der Lage zu zyklisieren, was das Reaktionsgleichgewicht auf Seiten des Produkts verschiebt. Bei den hier gezeigten Reaktionen wurden jedoch nur geringe Ausbeuten erzielt, was mitunter daran liegen kann, dass das Gleichgewicht auf Grund von elektronischen Effekten stark auf Seiten des offenkettigen Substrats liegt.

Tabelle 12. FSA^{D6X}-katalysierte Reaktionen mit nicht-hydroxylierten Aldoldonoren.^[128-130,133]

R ¹	R ²	R ³	FSA*	Ausbeute [%]	Referenz
CH ₂ OBn	H	Me	D6Q	77	[129]
CH ₂ OBn	-(CH ₂) ₂ -		D6Q	10 ^a	[129]
Et	Me	H	D6A/T26L	n.b. ^b	[133]
Et	H	Me	D6E	34	[133]
(CH ₂) ₂ OH	H	H	D6L/A165G	4	[129]
(CH ₂) ₂ OH	H	Me	D6H	32	[129]
	H	H	D6H	83	[128]
	H	Me	D6H	85	[128]
	H	Et	D6H	85	[128]
	-(CH ₂) ₃ -		D6H	82	[128]
ⁿ Pr	H	Me	D6E	10	[133]
ⁿ Pr	Et	H	D6A/T26L	n.b. ^b	[133]
	H	H	D6H	27	[129]
	H	Me	D6H	25	[129]

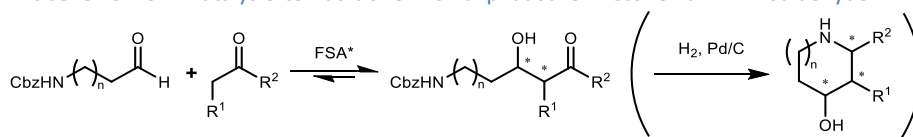
Tabelle 12. (fortgesetzt)



R ¹	R ²	R ³	FSA*	Ausbeute [%]	Referenz
	-(CH ₂) ₂ -		D6H	22	[129]
	-(CH ₂) ₃ -		D6H	8	[129]
	H	H	D6H	14	[129]
	H	Me	D6H	13	[129]
ⁱ Bu	H	Me	D6E	21	[133]
ⁿ Bu	H	Me	D6E	18	[133]

i) NaBH₄, MeOH; ii) 2,2-Dimethoxypropan, pTsOH; ^aDiastereomerenverhältnis: *dr* = 75:25; ^bnicht bestimmt. Nachweis und Charakterisierung des derivatisierten Produkts mittels GC und NMR.

Aufbauend auf den obigen Ergebnissen wurden auch verschiedene Aminoaldehyde mit aliphatischen Ketonen umgesetzt. Durch Hydrierung der Reaktionsprodukte können hier *N*-heterozyklische Derivate von Piperidin, Pyrrolidin sowie *N*-bicyklische Strukturen mit kondensierten Cyclobutan- oder Cyclopentanringen erhalten werden.^[131]

Tabelle 13. FSA*-katalysierte Additionen von aliphatischen Ketonen an Aminoaldehyde.^[131]

n	R ¹	R ²	FSA*	Stereo (<i>er</i> oder <i>dr</i>)	Umsatz [%]	Ausbeute [%]
0	H	Me	A165G	99:1 ^a	95	35
0	H	Et	A165G	88:12	60	28
0	Me	Et	D6T	87:13	47	30
0	-(CH ₂) ₂ -		A165G	>95:5 ^b	87	37
0	-(CH ₂) ₃ -		A165G	50:50 ^b	50	38
1	H	H	qm ^c	n.b. ^e	85	45 ^d
1	H	Me	D6N	98:2 ^a	94	85
1	H	Et	D6E	86:14	78	48
1	Me	Et	D6E	>97:3 ^b	71	35
1	-(CH ₂) ₂ -		D6L	80:20 ^b	56	46
1	-(CH ₂) ₃ -		A165G	67:33 ^b	75	65

^a*er* bestimmt durch HPLC; ^b*dr* bestimmt durch NMR; ^cqm: L107Y/A129G/R134S/A165G/S166G; ^disoliert als Hemiaminal im Gleichgewicht mit offener Kette; ^e*er* nicht bestimmt. Optische Rotation: $[\alpha]_{D}^{20} = +8.5$ (c = 2.1 in MeOH).

1.6 Stand der Forschung – D-Desoxyribose-5-phosphat-Aldolase

WONG *et al.* berichteten als erste über verschiedene DERA-katalysierte Aldoladditionen von Acetaldehyd, Aceton, Fluoraceton und Propionaldehyd an diverse Aldehyde, was in Grundzügen das breite Anwendungspotential des Katalysators zeigt.^[56-57,61,63] Im Gegensatz zu den anderen Donoren, weist Fluoraceton zwei reaktive Donorzentren auf, wobei in der Literatur für DERA^{Ec} bisher ausschließlich eine regioselektive Addition der Methylgruppe beobachtet wurde.^[56] Obwohl die Enzymaktivität für DERA^{Ec} mit nicht-phosphorylierten Substraten deutlich geringer ist, sind 2-Hydroxyaldehyde noch verhältnismäßig gute Akzeptoren, wobei D-Isomere bessere Substrate als L-Isomere sind. Grundlegend werden D-konfigurierte Substrate mit polaren Gruppen in der C2-Position bevorzugt umgesetzt, was auf die räumlich günstigere Orientierung der D-Isomere im aktiven Zentrum zurückzuführen ist. Die Ausbeuten einiger Produkte sind jedoch in manchen Fällen so gering, dass teils große Mengen an Enzym benötigt werden.^[56-57,61,63] Bei polaren, hydroxylierten Substraten fallen die Ausbeuten allgemein höher aus als bei weniger polaren, aliphatischen Substraten. Bei 2-Hydroxyaldehyden können selektiv Einfachadditionsprodukte erhalten werden, da Letztere zyklische Halbacetale ausbilden können, womit diese effektiv aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt werden (Tabelle 14).

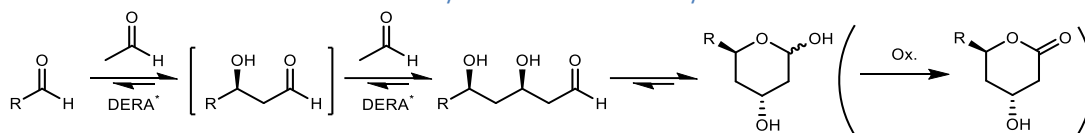
Tabelle 14. DERA^{Ec}-katalysierte Einfachaddition von Acetaldehyd, Aceton, Fluoraceton und Propionaldehyd an 2-Hydroxyaldehyde und aliphatische Aldehyde.^[56-57,63]

R ¹	R ²	R ³	Ausbeute [%]	Referenz
	H	H	18	[57]
	H	H	33	[57]
	H	H	37	[57]
	H	H	30	[63]
	H	H	65	[57]
	H	H	86	[56]
	H	H	76	[57]
	H	Me	66	[57]
	H	CH ₂ F	70	[57]
	H	H	33	[63]

Tabelle 14. (fortgesetzt)

R ¹	R ²	R ³	Ausbeute [%]	Referenz
	H	H	18	[57]
	H	H	12	[63]
	H	H	51	[63]
	H	H	62	[57]
	H	H	46	[63]
	H	H	46	[63]
	H	H	27	[63]
	H	H	58	[63]
	Me	H	44	[56]
	H	CH ₂ F	40	[56]

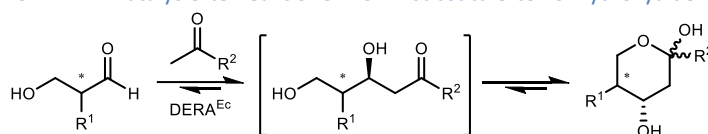
Wenn die gebildeten Aldoladdukte aus dem ersten Reaktionsschritt keine stabilen zyklischen Halbacetale ausbilden können, besteht die Möglichkeit einer Zweifach-, in Ausnahmen auch einer Mehrfachaddition, wobei die gebildeten Produkte zu δ -Lactolen zyklisieren können. LAURENT *et al.* konnten zeigen, dass eine Vierfachaddition von Acetaldehyd an Hydroxypyruvaldehydphosphat möglich ist, wobei das Zielprodukt zweifach zyklisiert.^[132] Als Substrate wurden bisher einfache lineare Aldehyde^[61,63,132,134-135] (Tabelle 15) und α -verzweigte 3-Hydroxyaldehyde^[136] (Tabelle 16) eingesetzt.

Tabelle 15. Zweifachaddition von Acetaldehyd an substituierte Aldehyde durch DERA-Varianten.^[61,63,132,134-135]

R	DERA*	Ausbeute [%]	Referenz
CH ₃	Ec	64 ^a	[61]
CH ₂ OH	Ec	<3 ^b	[61]
CH ₂ OMe	Ec	65	[63]
CH ₂ OPO ₃ ²⁻	Ec	<3 ^c	[61]
CH ₂ Cl	F200I	86	[134]
CH ₂ N ₃	Ec	23	[63]
CO ₂ H	Ec	<3	[61]
CH(CH ₃) ₂	Ec	13	[61]
CH ₂ CH ₂ Cl	S238D	k.A. ^d (35) ^e	[135]
CH ₂ CH ₂ N ₃	S238D	k.A. ^d (43) ^e	[135]
C(O)CH ₂ OPO ₃ ²⁻	Ec	86 ^f	[132]
CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	Ec	80	[63]

^a6% Dreifachadditionsprodukt gebildet; ^b20% Einfachadditionsprodukt gebildet; ^cAusbeute nach Behandeln mit Phosphatase; ^dkeine Angabe; ^eAusbeute für das Lacton über 2 Stufen; ^fVierfachadditionsprodukt.

Mit 2-substituierten 3-Hydroxyaldehyden können durch Einfachaddition ebenfalls δ -Lactole erhalten werden. Auffällig ist, dass je nach Stereokonfiguration in C2-Position entweder bevorzugt nur das (*R*)- oder das (*S*)-Substrat umgesetzt wird. Wahrscheinlich hat hier eine Kombination aus elektronischen und sterischen Effekten der Substituenten einen Einfluss auf die Enantiopräferenz.

Tabelle 16. DERA^{Ec}-katalysierte Reaktionen von 2-substituierten 3-Hydroxyaldehyden.^[136]

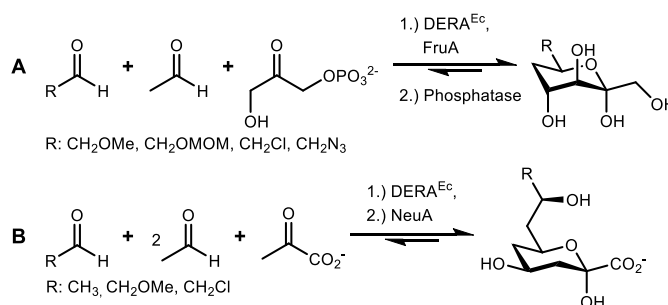
R ¹	R ²	Stereo	Ausbeute [%]
H	H	-	65
OH	H	<i>rac</i> (<i>R</i>) ^a	60 ^a
N ₃	H	<i>rac</i> (<i>R</i>) ^a	47 ^a
N ₃	Me	<i>rac</i> (<i>R</i>) ^a	28 ^a
Me	H	<i>S</i>	48 ^b
Me	H	<i>R</i>	<1 ^b
OMe	H	<i>rac</i> (<i>S</i>) ^a	22 ^a

^aStereokonfiguration des umgesetzten Enantiomers; ^bAusbeute bezogen auf das reaktive Enantiomer.

Um Reaktionen mit sequenzieller Mehrfachaddition zu ermöglichen, muss der Startaldehyd so gewählt werden, dass reaktive Gruppen blockiert werden, welche ansonsten eine sequenzielle Addition durch intramolekulare Zyklisierung verhindern würden. Mehrfachadditionen über die zweite Addition hinaus sind zwar prinzipiell möglich, über diese wurde bislang jedoch nur in Ausnahmefällen berichtet. Solche Kaskadenreaktionen

benötigen im Vergleich zur Einfachaddition normalerweise deutlich längere Reaktionszeiten. Um das Reaktionsgleichgewicht auf Seiten des Trimers zu verschieben, sind einerseits höhere Substratkonzentrationen des Aldoldonors und andererseits eine höhere Enzymkonzentration nötig. DERA^{Ec} birgt den Nachteil, dass das Enzym bei höheren Acetaldehydkonzentrationen über die Bildung von Crotonaldehyd desaktiviert wird (Kapitel 1.2.6).^[59] Durch langsame Zugabe des Aldoldonors, beispielsweise über eine Spritzenpumpe, können diese Einschränkungen teilweise minimiert werden.

Durch Kombination von DERA^{Ec} und FruA aus Kaninchenmuskel sind sequenzielle Aldoladditionen in Form von Eintopfsynthesen möglich, wobei 5-Desoxyketosen erhalten werden (Schema 23, **A**).^[60-61] Durch Kombination von DERA^{Ec} mit NeuA lassen sich Sialinsäureanaloga herstellen (Schema 23, **B**).^[61] Im Gegensatz zur Kombination mit FruA lässt sich die sequenzielle Addition mit DERA und NeuA nicht im Eintopfverfahren durchführen, da die Reaktionsbedingungen beider Enzyme inkompatibel sind.



Schema 23. A) Eintopfsynthesen von 5-Desoxyketosen mit DERA^{Ec} und FruA (aus Kaninchenmuskel).^[60-61] B) Zweistufensynthesen von Neuraminsäureanaloga mit DERA^{Ec} und NeuA.^[61]

Mit der DERA aus *Arthrobacter chlorophenolicus* konnten erstmals aliphatische Ketone an D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und Hydroxypyruvaldehydphosphat addiert werden (Tabelle 17).^[137] Dies ermöglicht es, ungewöhnliche Desoxyzucker zu generieren, die durch klassisch-chemische Synthesen bisher nicht hergestellt werden konnten.

Tabelle 17. DERA-katalysierte Additionen von aliphatischen Ketonen an D-Glycerinaldehyd-3-phosphat oder Hydroxypyruvaldehydphosphat.^[132,137]

X	R ¹	R ²	DERA*	Ausbeute [%]	Referenz
(S)-CHOH	OH	H	Ac	89	[137]
(S)-CHOH	OH	CH ₂ OH	Ac	65	[137]
(S)-CHOH	Me	H	Ac	88	[137]
(S)-CHOH	H	Me	Ac	72	[137]
C(O)	H	Me	Ec	56	[132]
(S)-CHOH	-(CH ₂) ₂ -		Ac	74	[137]
(S)-CHOH	-(CH ₂) ₃ -		Ac	68	[137]
C(O)	-(CH ₂) ₃ -		Ac	44	[132]

Von Interesse könnten solche Substrate zur Synthese biologischer Wirkstoffe sein, welche Ketose- oder Aldosestrukturen und eine Cyclobutanoneinheit (**A**), L-*lyxo*- oder L-*tagato*-Konfiguration (**B**) oder α-methylierte Carbonylstruktur (**C**) enthalten. Die in Abbildung 8 gezeigten Strukturen enthalten zwar die gesuchten

Strukturfragmente, jedoch ist anzumerken, dass die in Tabelle 17 gezeigten Strukturen nicht ohne weiteres dazu genutzt werden können, um diese Wirkstoffe in einer Totalsynthese aufzubauen. Chemisch betrachtet sind deutliche Modifikationen der Moleküle notwendig, welche teilweise vor dem Enzym-katalysierten Schritt stattfinden müssen, sodass die daraus resultierenden Substrate eventuell nicht mehr von der DERA umgesetzt werden können.

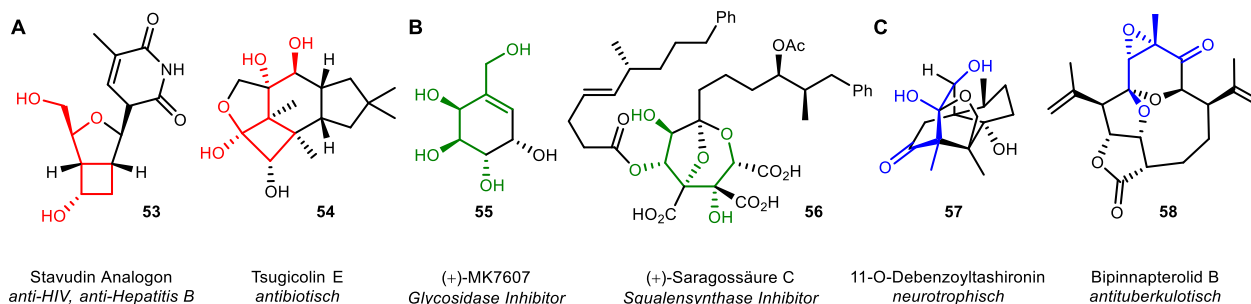


Abbildung 8. Auswahl biologisch interessanter Wirkstoffe mit Ketose- oder Aldosestruktur, die einen Cyclobutanring (A, in rot), eine L-lyxo- oder L-tagato-Konfiguration (B, in grün) oder α-methylierten Carbonylstruktur (C, in blau) enthalten.^[137]

DERA aus *Thermatoga maritima* (DERATM) ist in der Lage, Acetaldehyd und Aceton an Aminoaldehyde zu addieren (Tabelle 18). Es zeigt sich, dass auch in 2-Position verzweigte Aminoaldehyde problemlos umgesetzt werden können, wobei nur teilweise eine Stereopräferenz der Akzeptorsubstrate beobachtet wurde. Allgemein werden bevorzugt Reaktionsprodukte mit (S)-Konfiguration an der ehemaligen Aldehydgruppe gebildet,^[138] im Fall von Cbz-geschütztem (R)-2-Aminopropanal ist hingegen keine vollständige Diastereoselektivität zu beobachten. Durch katalytische Hydrierung werden aus den Reaktionsprodukten N-heterozyklische Derivate von Pyrrolidin und Piperidin zugänglich.^[131]

Tabelle 18. DERATM-katalysierte Additionen von Acetaldehyd und Aceton an Aminoaldehyde.^[131]

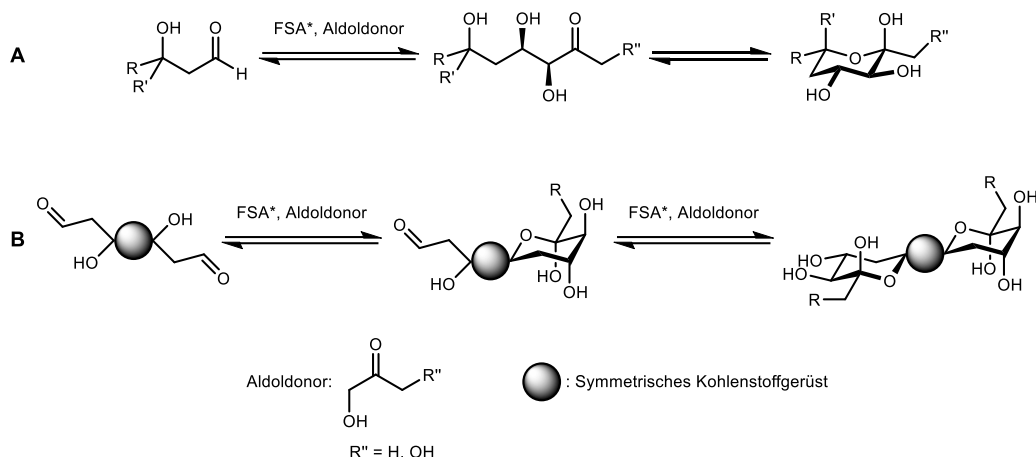
n	R ¹	R ²	Stereo (<i>er</i> oder <i>dr</i>)	Umsatz [%]	Ausbeute [%]
0	H	Me	95:5 ^a	85	30
0	(S)-Me	H	>95:5 ^b	85	34
0	(R)-Me	H	>95:5 ^b	80	20
0	(S)-Me	Me	>95:5 ^c	81	79
0	(R)-Me	Me	77:23 ^c	91	78
1	H	H	n.b. ^d	77	25
1	H	Me	92:8 ^a	70	47

^a*er* bestimmt durch HPLC; ^bHauptprodukt mit (3S) gebildet; ^cHauptprodukt mit (4S) gebildet; ^dnicht bestimmt.

2 Zielsetzung

Aldolasen finden aktuell fast nur in der Forschung Anwendung. Deren Bedeutung hat dort einen eher explorativen Charakter, während sie zur Synthese komplexer organischer Moleküle bisher nur vereinzelt genutzt werden. Dies ist insofern bemerkenswert, da teils keine adäquaten klassisch-chemischen Katalysatoren bekannt sind bzw. bekannte Katalysatoren oft keine ähnlich herausragende Stereoselektivität wie entsprechende Enzyme aufweisen. In Hinblick auf eine möglichst effiziente Synthese ist es wünschenswert, wenn dem präparativ arbeitenden Chemiker eine Palette an Werkzeugen zur Verfügung steht, mit der sich C–C-Knüpfungen, in Anbetracht ihrer jeweiligen Anforderungen, effizient ausführen ließen. Gerade die FSA kann hierbei ein passendes Werkzeug darstellen und bietet eine sinnvolle Ergänzung zu den bekannten stereoselektiven C–C-Knüpfungsmethoden. Wie in Kapitel 1.5 beschrieben, ist die FSA in Bezug auf ihre Substrattoleranz und -breite relativ gut untersucht. Als Aldolakzeptoren ohne Aminosubstitution wurden nur Glykol- bzw. Glycerin-basierte Aldehyde^[45,116,122] und lineare bzw. strukturell einfache, verzweigte Aldehyde^[43,114-115,117,124] getestet. Über erfolgreiche FSA-katalysierte Synthesen mit zyklischen, voluminösen Substituenten sowie Aldolase-katalysierten bidirektionalen Aldolreaktionen an Dialdehyden, speziell mit der FSA, wurde bisher nicht berichtet. Bidirektionale Aldolreaktionen wurden bis dato nur an ausgewählten Fallbeispielen mit der Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (FruA) demonstriert, welche DHAP als Aldoldonor verwendet.^[109-110,113] Das Konzept der bidirektionalen Synthese auf die FSA auszuweiten besitzt den Vorteil, dass deren Donorsubstrate, anders als DHAP, leicht zugänglich und stabil sind und der Folgeschritt der Dephosphorylierung entfällt, wobei in einem Schritt komplexe Desoxyzucker erhalten werden könnten. In Anbetracht einer einfach zugänglichen Synthesemethode zu C-Glykosiden als Disaccharidmimetika stellt die Untersuchung der FSA daher ein erstrebenswertes Ziel dar.

Für α -verzweigte 2-Hydroxyaldehyde sind, bis auf 2-Hydroxy-2-methylpropanal (Tabelle 7), keine Substrate bekannt, die von der FSA und deren Varianten umgesetzt werden können.^[120] Untersuchungen mit α -alkylierten Aminoaldehyden wie (*R*)- und (*S*)-*N*-Cbz-Alaninal zeigten die Grenzen des Machbaren für FSA-Varianten wie FSA^{wt} und FSA^{A129S} auf. Eine weitere Erhöhung der Kettenlänge von Substituenten in α -Position erwies sich als schwierig, wie Beispielreaktionen an geschützten tertiären α -Aminoaldehyden belegen (Tabelle 1 und Tabelle 5).^[114-115] Aufgrund dieser Beobachtung und dem Umstand, dass bisher keine Substrate mit zyklischen oder anderen sperrigen Substituenten in β -Stellung näher untersucht wurden, bestand zudem die Überlegung, die Substituenten um ein Kohlenstoffatom weiter in die β -Position zu verschieben. Die beiden D-Fructose-6-phosphat-Aldolase-Varianten FSA^{wt} und FSA^{A129S} sollten deshalb im Rahmen dieser Arbeit (Kapitel 3) zuerst auf ihr Potential zur Umsetzung von strukturell variantenreichen Mono-(3-hydroxy)aldehyden untersucht werden, da nach bisheriger Erfahrung kleine, meist polare Aldehydakzeptoren die besten Chancen boten (Schema 24, **A**). Darauf aufbauend sollten dann sowohl 3-Hydroxyaldehyde mit sperrigen aliphatischen oder mehrzyklischen Substitutionsmustern, als auch lineare, strukturell einfache Dialdehyde untersucht werden. Basierend auf diesen Ergebnissen und analog zu den Versuchen mit der FruA von PETERSEN *et al.*,^[113] sollten aus naheliegenden Gründen der Einfachheit halber insbesondere symmetrische Bis-(3-hydroxy)aldehyde auf Aktivität mit der FSA getestet werden (Schema 24, **B**). Im Fall von positiven Screening-Ergebnissen sollten die Substrate präparativ umgesetzt und die erhaltenen Reaktionsprodukte zur Struktursicherung vollständig charakterisiert werden.

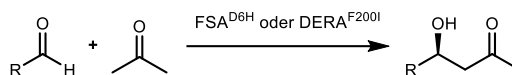


Schema 24. FSA*-katalysierte Reaktionen mit Mono-3-hydroxyaldehyden (**A**) und Tandem-Reaktionen mit Bis-(3-hydroxyaldehyden) (**B**). Die Produkte der Tandem-Reaktionen sind in zyklischer Form dargestellt. Das Kugelelement stellt ein rotations- oder spiegelsymmetrisches Kohlenstoffgerüst dar, welches die beiden 3-Hydroxyaldehydgruppen verbindet.

Wie unter Kapitel 1.2.6 ausführlich beschrieben katalysiert die DERA *in vivo* die reversible Reaktion zwischen D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und Acetaldehyd. Da D-Glycerinaldehyd-3-phosphat sehr polar ist und eine labile Phosphatgruppe besitzt, wurden verschiedene Versuche unternommen, das Akzeptorspektrum von der DERA auf weniger polare sowie stabilere Substrate zu erweitern. WONG *et al.* zeigten, dass das um ein Kohlenstoffatom kürzere Substrat 2-Oxoethylphosphat nur schlecht umgesetzt wird, während der Wechsel auf ein vollständiges Kohlenstoffgerüst, in Form von Bernsteinsäuresemialdehyd (BSA), von der DERA^{Ec} sehr gut umgesetzt wird (Tabelle 15).^[60] Vergleicht man BSA mit D-Glycerinaldehyd-3-phosphat, so weist Ersteres ähnliche elektronische Eigenschaften auf, unterscheidet sich jedoch darin, dass das Grundgerüst ein Atom kürzer und die Carboxylatgruppe im Vergleich zur Phosphatgruppe hydrolysestabil ist. Diese Carboxylgruppe ermöglicht zudem anderweitige Optionen zur Funktionalisierung der gebildeten Produkte, was im Fall einer Phosphatgruppe weniger einfach wäre.

BSA stellt somit ein wertvolles Startmolekül dar, von dem aus durch DERA-katalysierte Reaktionen mit den üblichen Aldondonoren chirale hydroxylierte C₇/C₈-Carbonsäuren zugänglich sein sollten, welche für die chemische Synthese von Wirk- und Werkstoffen interessant sind. Ausgehend von BSA kann je nach Aldodonor mindestens ein neues Stereozentrum selektiv aufgebaut werden. Werden Acetaldehyd und dessen Derivate als Donoren verwendet, wären Mehrfachadditionen möglich, was die Synthese komplexerer Synthesebausteine in nur einem Reaktionsschritt erlaubt (Kapitel 1.6). Da BSA zwar früher kommerziell verfügbar war, aber seit Jahrzehnten mangels Nachfrage nicht mehr angeboten wird, ist ein erstes Teilziel dieser Arbeit die Etablierung einer neuen, geeigneten Syntheseroute für BSA. Bisher bekannte Synthesen weisen in Bezug auf Skalierbarkeit deutliche Einschränkungen hinsichtlich Durchführbarkeit, Kosten und Aufreinigungsprozeduren auf. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher zunächst eine praktikable Syntheseroute für BSA etabliert werden und darauf aufbauend diverse Aldolasen auf ihre katalytische Aktivität damit getestet werden. Im Erfolgsfall enzymkatalysierter Synthesen sollten die erhaltenen Reaktionsprodukte zu einer Plattform an funktionalisierten Synthesebausteinen derivatisiert werden.

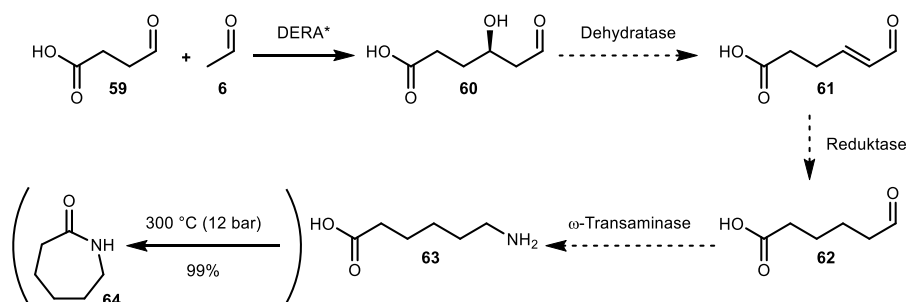
Themenübergreifend sollten sowohl die Variante FSA^{D6H} als auch DERA^{F200I} mit diversen Aldehydakzeptoren umgesetzt werden, da beide Enzyme in der Lage sind, Aceton als Aldodonor zu verwenden (Schema 25).



Schema 25. Potentielle Komplementarität von FSA^{D6H} und DERA^{F200I} in der Umsetzung von Aldehyden mit Aceton als Nukleophil.

Hierbei sollten sowohl lineare aliphatische Dialdehyde, als auch BSA als potentielle Substrate getestet werden.

Ein weiterer Einsatz von BSA als Startsubstrat wäre die Entwicklung einer Enzymkaskade mit dem Ziel, ε-Caprolactam zu erhalten (Schema 77). Dieser Prozess wäre eventuell relevant für eine industrielle Nutzung, weil ε-Caprolactam in der Polymerchemie ein wichtiger Baustein zur Herstellung von Nylon-6 (Perlon) ist, wobei der weltweite Bedarf an ε-Caprolactam bei über 5 Millionen Tonnen pro Jahr liegt.^[139-140] Da bisherige chemische Synthesen mit dem Anfall hoher Mengen an Abfallprodukten verbunden sind, wären alternative Syntheserouten erstrebenswert. Hierbei können biotechnologische Prozesse mit Enzymkaskadenreaktionen von Vorteil sein, da diese eventuell von günstigeren Materialien aus gehen, oft eine hohe Atomökonomie aufweisen und/oder weniger (toxische) Abfallprodukte auftreten.



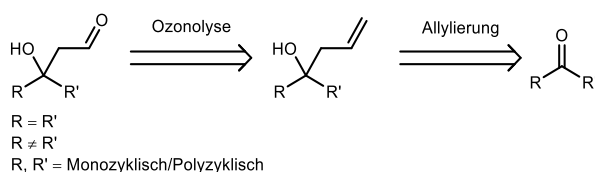
Schema 26. Mögliche enzymatische Syntheseroute zu 6-Aminohexansäure (63) ausgehend von BSA (59). Im Anschluss könnte 63 in ε-Caprolactam (64) überführt werden.^[141]

3 Allgemeiner Teil – D-Fructose-6-phosphat-Aldolase

3.1 Synthesen von Hydroxyaldehyden

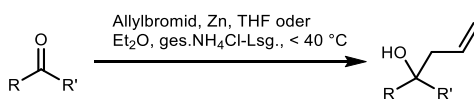
3.1.1 Synthese von 3-Hydroxyaldehyden – Grundlagen

Um die Akzeptanz von FSA in Bezug auf 3-Hydroxyaldehyde testen zu können, musste ein Großteil der Substrate vorab synthetisiert werden. Retrosynthetisch betrachtet sind 3-Hydroxyaldehyde von 3-Hydroxyallylverbindungen aus zugänglich, welche wiederum durch Allylierung von Ketonen erhalten werden können (Schema 27).



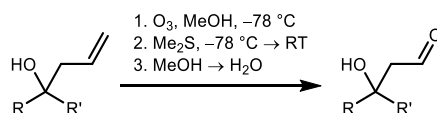
Schema 27. Retrosynthese von 3-Hydroxyaldehyden zurückgeführt auf Ketone.

Als Startsubstrat können (un-)symmetrische Ketone gewählt werden. Je nach Komplexität wurden entweder kommerzielle Ketone verwendet, oder diese unabhängig hergestellt. Die Allylierung wurde als Barbier-Reaktion nach MOSKALENKO *et al.* mit säurekatalysiertem Zink durchgeführt.^[142] Die Reaktionsbedingungen sind im Vergleich zu Grignard-Reaktionen milde, da in wässrigem Solvenssystem gearbeitet werden kann und keine Inertgasatmosphäre benötigt wird. Dies macht die Methode attraktiver, da sich größere Mengen der Allylverbindung so auf relativ einfachem, sicherem und preiswertem Weg herstellen lassen.



Schema 28. Allylierung von Ketonen nach Barbier.

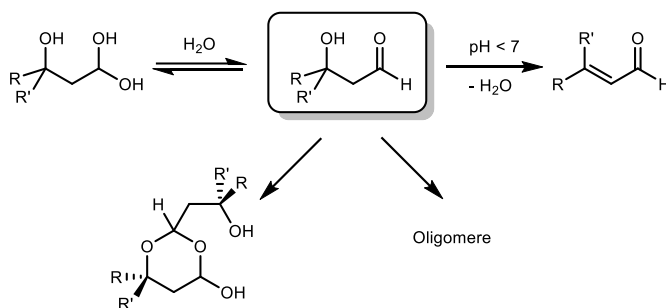
Die Ozonolyse erfolgte in Methanol unter reduktiver Aufarbeitung mit Dimethylsulfid, wobei die gebildeten 3-Hydroxyaldehyde durch sukzessiven Lösungsmittelaustausch in Wasser überführt wurden (Schema 29).



Schema 29. Ozonolyse von 3-Hydroxyallylverbindungen.

Die Handhabung in wässriger Lösung ohne Isolierung erfolgte aufgrund der Beobachtung, dass 3-Hydroxyaldehyde dazu neigen, beim Entfernen des Lösungsmittels in Gegenwart von Säurespuren di- oder oligomere (Halb-)Acetale auszubilden (Schema 30). Zudem kann bei der Ozonolyse eine Überoxidation der Aldehydfunktionalität zu korrespondierenden Carbonsäuren auftreten. Die Carboxylfunktionalität senkt den pH-Wert der wässrigen Lösung, wodurch eine Eliminierung zum α,β -ungesättigten Aldehyd erleichtert wird. letzterer ist durch Mesomeriestabilisierung energetisch begünstigt. Tatsächlich ließen sich NMR-spektroskopisch an ausgewählten Beispielen isolierter Aldehyde im ^{13}C -Spektrum die in α,β -ungesättigten Aldehyden typischen olefinischen Signale um 130 und 160 ppm beobachten. Dies untermauert die Vermutung, dass es aufgrund der zwangsläufig leicht sauren Reaktionsbedingung zur Eliminierung kommt. Versuche, die

Lösung pH-neutral einzustellen, trugen nicht dazu bei, dass die Eliminierung verhindert wird. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Stabilität des Produktes temperaturabhängig ist. Der Lösungsmittelaustausch wurde daher an einem Rotationsverdampfer bei maximal 40 °C durchgeführt. Bei höheren Temperaturen wurde ein Ausfallen/Ausölen des Aldehyds bzw. seiner Kondensationsprodukte direkt ersichtlich. In wässriger Lösung kann das Substrat je nach Substitutionsmuster zu unterschiedlichen Anteilen im Gleichgewicht mit dem Aldehyd als Hydrat vorliegen. Dies erhöht die Löslichkeit und maskiert gleichzeitig die Reaktivität was folglich das Substrat stabilisiert.



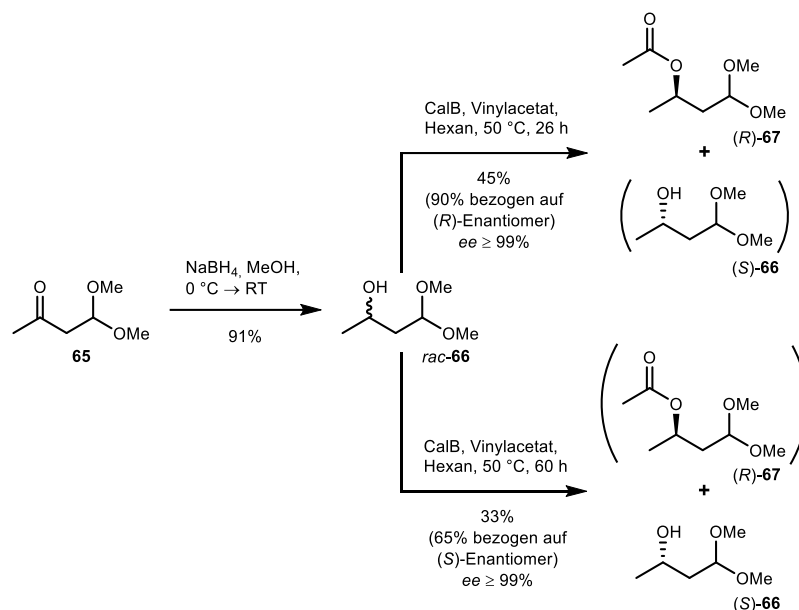
Schema 30. Mögliche Reaktionswege von 3-Hydroxyaldehyden.

Gerade bei größeren aliphatischen Resten ist zu beobachten, dass beim Austausch des Lösungsmittels zu Wasser die Lösung zunächst trübe wird und anschließend das Material ausfällt oder ausölt. Grund hierfür ist die zunehmende Hydrophobizität des Substrats durch eine abnehmende Polarität, woraus eine Verringerung der Löslichkeit in wässriger Lösung resultiert. Allgemein war dieser Effekt bei Konzentrationen größer 250 mM zu beobachten. Bei den tertiären 3-Hydroxyaldehyden konnte exemplarisch gezeigt werden, dass beim Wechsel des Lösungsmittels auf eine 20%ige DMSO-Lösung eine relative Stabilisierung zu beobachten ist. Dies kann einerseits daran erkannt werden, dass weniger bzw. kein Niederschlag entsteht und andererseits daran, dass die FSA-katalysierten Reaktionen in 20% DMSO im Vergleich zum rein wässrigen Solvens durchschnittlich mit besseren Ausbeuten ablaufen (Kapitel 3.2.4).

3.1.2 Synthesen linearer Hydroxyaldehyde

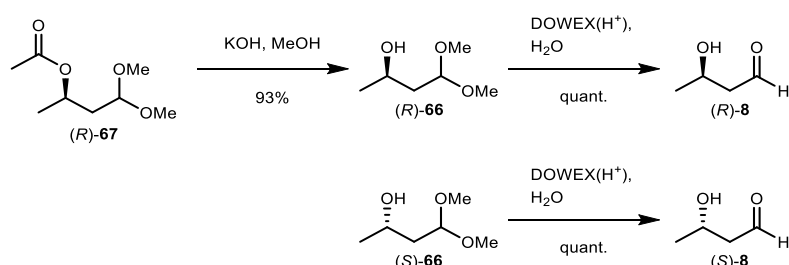
Frühere Studien zeigten, dass hydroxylierte aliphatische Aldehyde in FSA-katalysierten Reaktionen im Allgemeinen gegenüber unsubstituierten Substraten bevorzugt werden.^[120] Die insgesamt bessere Reaktivität dieser Substrate in Aldolreaktionen basiert auf ihrer erhöhten Elektrophilie.^[113] Als strukturell einfachster, unverzweigter 3-Hydroxyaldehyd wurde 3-Hydroxypropanal bereits mehrfach untersucht.^[120,127] Trotz der hervorragenden Eigenschaften als Aldolakzeptor, neigt die Verbindung unter schwach sauren Reaktionsbedingungen zur Eliminierung, wodurch Acrolein gebildet wird. Letzteres kann jedoch in einer Aldolase-katalysierten Reaktion zu einer partiellen Inhibierung des Enzyms beitragen.^[128] Als Startpunkt für in 3-Position verzweigte 3-Hydroxyaldehyde wurden (*R*)- und (*S*)-3-Hydroxybutanal (**8**) ausgewählt. Die Synthese von (*R*)- sowie (*S*)-**8** erfolgte nach PURDER.^[143] Ausgehend von kommerziellem 4,4-Dimethoxybutan-2-on (**65**) wurde zunächst mit Natriumborhydrid zum Alkohol reduziert, der dann durch kinetische Deracemisierung mit *Candida antarctica* Lipase B (CalB) in den jeweiligen enantiomerenangereicherten (*R*)- bzw. (*S*)-Alkohol von **66** abgespalten wurde. Durch Kontrolle der Reaktionszeit lässt sich das jeweilige Enantiomer in ausreichenden Ausbeuten und sehr guten Enantiomerenüberschüssen erhalten (Schema 31). Nach 26 Stunden wurde (*R*)-**67** mit einer Ausbeute von 45% (90% bezogen auf das (*R*)-Enantiomer) mit einem Enantiomerenüberschuss von

$ee \geq 99\%$ erhalten. Nach längerer Reaktionszeit von 60 Stunden wurde (*S*)-**66** in 33% Ausbeute (65% bezogen auf das (*S*)-Enantiomer) ebenfalls mit einem Enantiomerenüberschuss von $ee \geq 99\%$ erhalten.



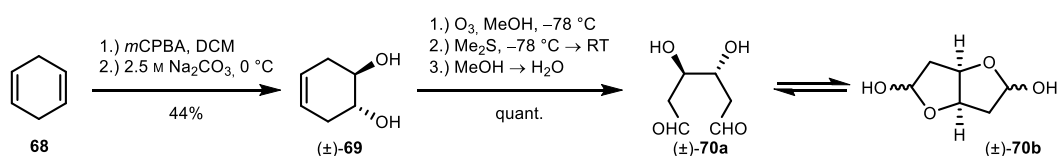
Schema 31. Synthese von (*R*)-4,4-Dimethoxybutan-2-ylacetat ((*R*)-**67**) und (*S*)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol ((*S*)-**66**) durch kinetische Deracemisierung von *rac*-4,4-Dimethoxybutan-2-ol *rac*-**66**.

Der acetylgeschützte Alkohol (*R*)-**67** wurde durch Behandlung mit Kaliumhydroxid in 93% Ausbeute zum Alkohol (*R*)-**66** verseift (Schema 32). Durch wässrige Deblockierung der Acetale (*R*)- sowie (*S*)-**66** wurden die enantiomerenreinen Aldehyde (*R*)-**8** und (*S*)-**8** quantitativ erhalten, wobei diese aufgrund ihrer Labilität bevorzugt in Lösung gehandhabt wurden.^[129]



Schema 32. Synthese von (*R*)- und (*S*)-3-Hydroxybutanal (**8**).

Als strukturell verwandter Dialdehyd für bidirektionale Synthesen kam racemisches *threo*-3,4-Dihydroxyhexandial ((\pm)-**70**) in Frage. Der Dialdehyd (\pm)-**70** stellt prinzipiell den strukturell einfachsten Bis-(3-hydroxyaldehyd) zur Synthese von verbrückten C-glycosidischen Disacchariden dar, da die in der der Aldolase-katalysierten Reaktion gebildeten Kohlenhydrate direkt miteinander verknüpft sind. (\pm)-**70** kann bequem über zwei Stufen synthetisiert werden (Schema 33).

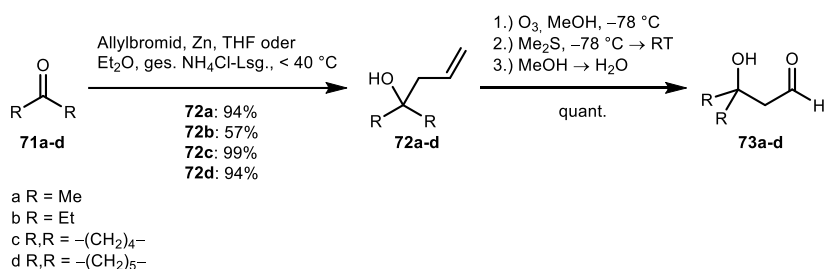


Schema 33. Synthese von (\pm)-3,4-Dihydroxyhexandial ((\pm)-**70**).

Im ersten Reaktionsschritt wurde Cyclohexa-1,4-dien (**68**) mit *m*CPBA zum Monoepoxid umgesetzt und dieses anschließend im Basischen mit 44% Ausbeute zum (±)-Cyclohex-4-en-1,2-diol ((±)-**69**) geöffnet.^[144-145] Durch Ozonolyse mit reduktiver Aufarbeitung wurde der racemische Dialdehyd (±)-**70** erhalten. NMR-Untersuchungen von PETERSEN *et al.* zeigten, dass der Aldehyd in wässriger Lösung intramolekular stabile Halbacetale ((±)-**70b**) ausbildet.^[109]

3.1.3 Synthesen tertiär substituierter, offenkettiger und monozyklischer Hydroxyaldehyde

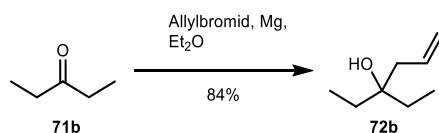
In einer früheren Arbeit wurde das Cyclopentylderivat **73c** in einer Aldolreaktion mit DHAP und FruA-katalysiert eingesetzt.^[146] Da ein solch relativ unpolarer 3-Hydroxyaldehyd erfolgreich in einer Aldolase-katalysierten Reaktion verwendet wurde, war es spannend, derartige symmetrisch substituierte aliphatische Aldehyde auch in Reaktionen mit FSA-Varianten und komplementären Nukleophilen zu testen. Daher wurde entsprechend eine Reihe von symmetrischen, tertiären 3-Hydroxyaldehyden synthetisiert, um die Bandbreite sperriger 3-Hydroxyaldehyde zu erweitern (Schema 34).



Schema 34. Zweistufensynthese tertiärer 3-Hydroxyaldehyde ausgehend von symmetrischen Ketonen.

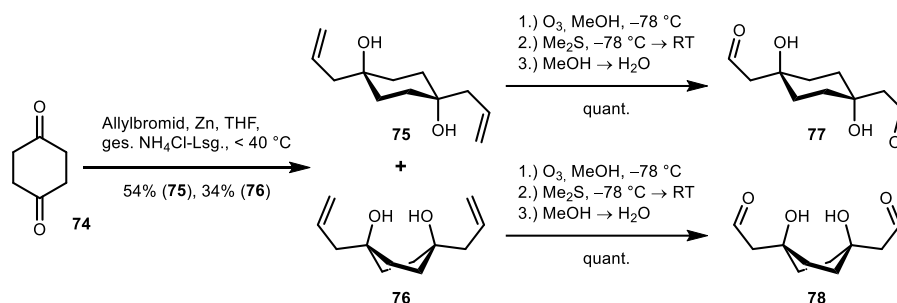
Hierfür wurden die Vorläuferketone **71a-d** in einer Barbier-Reaktion mit Allylbromid und Zink in schwach saurem Milieu umgesetzt. Die Ausbeuten waren ausgezeichnet und lagen bei allen Verbindungen über 90%, wobei Pentan-3-on (**71b**) die einzige Ausnahme davon war. Bei der Ozonolyse der Homoallylalkohole **72a-d** wurde die 3-Hydroxyaldehyde **73a-d** nahezu quantitativ umgesetzt. Wird die Ozonolyse in Dichlormethan anstelle von Methanol durchgeführt, so findet ebenfalls ein vollständiger Umsatz des Startsubstrats statt. Beim Konzentrieren der Aldehyde in wässriger Lösung sowie beim sequenziellen Wechsel von Dichlormethan auf Methanol und dann auf Wasser war jeweils das Präzipitieren/Ausölen der Substrate zu beobachten.

Wegen der relativ niedrigen Ausbeute von **72b** wurde die Reaktion wasserfrei unter Grignard-Bedingungen durchgeführt (Schema 35), wodurch die Ausbeute auf 84% gesteigert werden konnte.^[147] Aceton (**71a**) besitzt aufgrund seiner Geometrie ein stark ausgeprägtes Dipolmoment, während bei den zyklischen Substraten **71c** und **71d** das Dipolmoment bedingt durch die Rigidität des aliphatischen Rings ebenfalls relativ stark ausgeprägt ist. Bei Pentan-3-on (**71b**) ist der Dipolmoment weniger ausgeprägt, sodass sich hierdurch eventuell die niedrigere Ausbeute der Allylierung unter Barbier-Bedingungen erklären lässt.



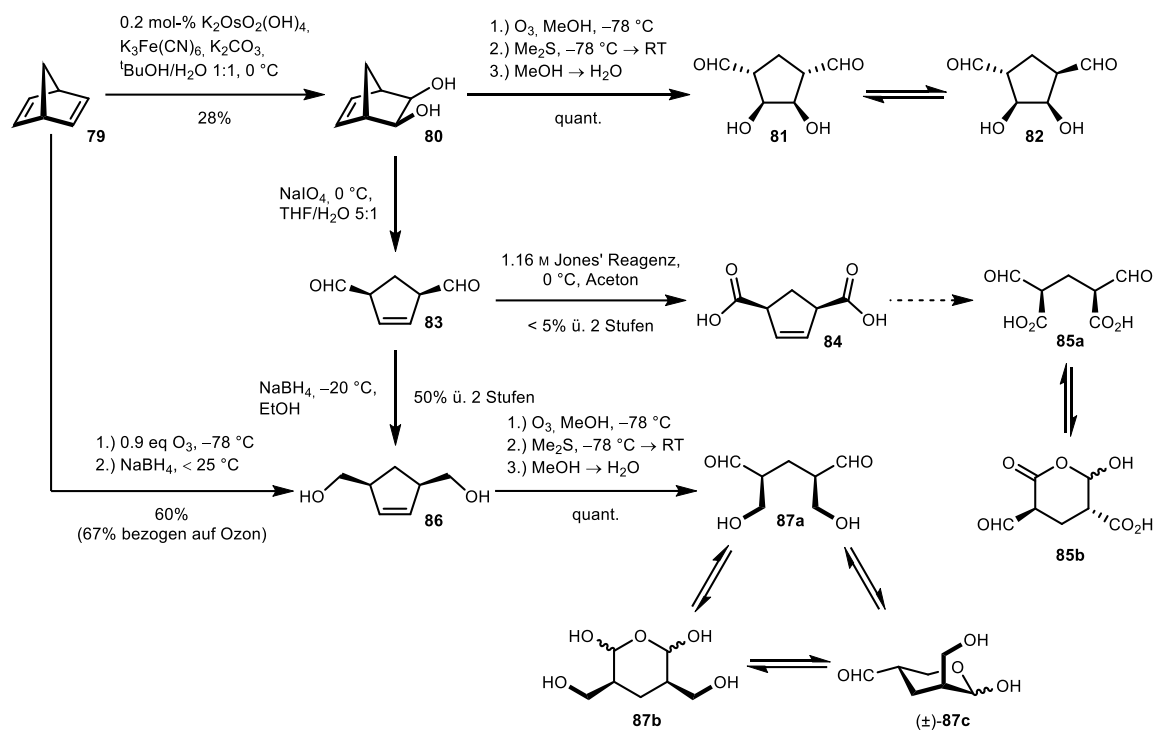
Schema 35. Allylierung von Pentan-3-on (**71b**) unter Grignard-Bedingungen.^[147]

Analog zum einfachen 2-(1-Hydroxycyclohexyl)acetaldehyd (**73d**) wurde auch Cyclohexan-1,4-diol **74** als Grundlage für symmetrische Dialdehyde in Erwägung gezogen. In einer früheren Arbeit von PETERSEN *et al.* wurden die beiden daraus abgeleiteten, stereoisomeren Dialdehyde **77** und **78** bereits erfolgreich in Tandemreaktionen mit FruA und DHAP eingesetzt,^[109] was als Motivation für einen Vergleich mit FSA-katalysierten Reaktionen diente. Bei der Allylierung des Diketons **74** wurde eine Mischung von zwei Diastereomeren im Verhältnis 54:34 erhalten, welche säulenchromatographisch in die *trans*-Diallylverbindung **75** in 54% und die *cis*-Diallylverbindung **76** in 34% Ausbeute getrennt werden konnte (Schema 36). Die Ozonolyse beider Diene erfolgte jeweils nach Standardprozedur unter quantitativer Bildung der gesuchten Dialdehyde.



Schema 36. Zweistufensynthese von Dialdehyden basierend auf Cyclohexan-1,4-dion (**74**).

PETERSEN *et al.* untersuchten daneben auch C₅-symmetrische Dialdehyde mit Cyclopentangerüst für FruA-katalysierte Reaktionen.^[109] Der Dialdehyd **82** wurde als potentielles Testsubstrat mit einer Cyclopentylbrücke ausgewählt. Er ähnelt von seiner Struktur her dem 2-(1-Hydroxycyclopentyl)acetaldehyd (**73c**) und wurde außerdem in FruA-katalysierten Reaktionen mit DHAP erfolgreich als Akzeptorsubstrat getestet,^[109] was es auch zu einem geeigneten Testkandidaten für FSA-katalysierte Reaktionen macht. Neben dem Dialdehyd sollten aus Norbornadien als Grundstruktur plausibel auch noch weitere geeignete Dialdehyde abgeleitet werden können (Schema 37).



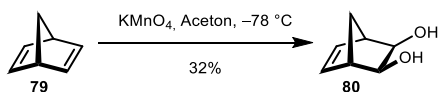
Schema 37. Synthesen von Dialdehyden basierend auf Norbornadien (79).

Norbornadien (79) kann unter Sharpless-Bedingungen dihydroxyliert werden.^[148] In diesem Fall wurde kein vorgefertigter AD-Mix verwendet, da für das symmetrische Startmaterial keine stereoselektive Dihydroxylierung notwendig war. Die Reaktion wurde bei Versuchen zur Ausbeuteoptimierung unter Variation der stöchiometrischen Äquivalente an $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ und K_2CO_3 durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19. Getestete Reaktionsbedingungen für die Dihydroxylierung von Norbornadien (79).

#	$\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	K_2CO_3	Ausbeute [%]
1	0.1 mol-%	0.5 eq	0.5 eq	25
2	0.2 mol-%	1.0 eq	1.0 eq	24
3	0.2 mol-%	3.0 eq	3.0 eq	28

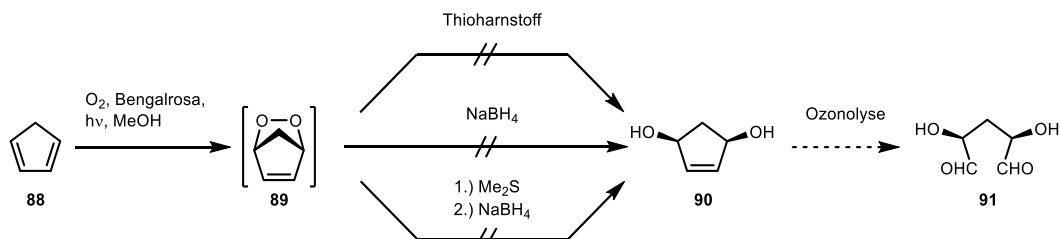
Bei allen drei getesteten Reaktionsbedingungen wurde eine ähnlich hohe Ausbeute erreicht. Die Reaktion unter Bedingung #1 erscheint am effizientesten, da hier die geringsten Mengen an Katalysator und Reagenzien benötigt werden. Alternativ kann Norbornadien auch preiswert und nicht-toxisch mittels Kaliumpermanganat oxidiert werden, wobei hier eine Ausbeute von 32% erreicht wurde (Schema 38).^[149] Dieser Syntheseweg erwies sich jedoch als weniger praktikabel, da hier der Aufreinigungsprozess durch Emulsionsbildung erschwert wurde, welche sich schwer trennen ließ und große Mengen an Lösungsmittel erforderte.

Schema 38. Dihydroxylierung von Norbornadien (79) mittels Kaliumpermanganat.^[149]

Das Diol **80** wurde mittels Ozonolyse gespalten, wobei die beiden Aldehydgruppen im Produkt **81** *cis*-ständig sind. Nach Beobachtungen von PETERSEN *et al.* kann jedoch unter den Reaktionsbedingungen der Aldoladdition

eine Epimerisierung einer Aldehydgruppe zum *trans*-ständigen Dialdehyd **82** eintreten.^[109] Mit Natriumperiodat wurde das Diols **80** unter C–C-Spaltung zum Dialdehyd **83** oxidiert,^[150] welcher sowohl oxidativ als auch reduktiv weiter umgewandelt wurde. Versuche, die Aldehydgruppen von **83** zur Carbonsäure zu oxidieren, gelangen mit Jones' Reagenz nicht in zufriedenstellenden Ausbeuten. Erstaunlicher Weise scheiterten auch Versuche, die Oxidation nach Literaturvorschrift mit Silber(I)oxid,^[151] mit Periodsäure oder Chrom(VI)oxid^[152] durchzuführen. Die Synthese des Dialdehyds **83** nach GROB *et al.* durch partielle Ozonolyse von Norbornadien (**79**)^[151] und dessen darauffolgende Oxidation mittels Silber(I)oxid wurde aufgrund der obigen Beobachtung nicht durchgeführt, obwohl in der Literatur Ausbeuten an **84** bis 49% berichtet werden. Eine ozonolytische Spaltung der Disäure **84** wurde wegen der geringen vorhandenen Substanzmengen nicht mehr durchgeführt. Die Reduktion des Dialdehyds **83** gelang jedoch mit Natriumborhydrid (50% Ausbeute über 2 Stufen).^[150] Wird Norbornadien durch kontrollierte Ozonolyse mit einem Unterschuss an Ozon umgesetzt und die erhaltene Produktlösung direkt mit Natriumborhydrid behandelt, kann das Diol **86** in 60% Ausbeute (67% bezogen auf Ozon) erhalten werden.^[151] Die Ozonolyse des Diols **86** erfolgte quantitativ, wobei der gebildete Dialdehyd **87a** aufgrund der in 5-Position befindlichen Hydroxygruppe intramolekular zyklisieren kann und daher in wässriger Lösung im Gleichgewicht zwischen seinen zyklischen Halbacetalen **87b** und (\pm)-**87c** und dem offenkettigen Dialdehyd **87a** vorliegt.^[113]

Der auf Cyclopentadien (**88**) basierende Bis-(2-hydroxy-)aldehyd **91**, sollte sich über zwei Stufen synthetisieren lassen. Durch Photooxidation mit Sauerstoff und Bengalrosa als Katalysator sollte das Peroxid **89** gebildet werden, welches im Anschluss reduktiv zum Diol **90** umgesetzt wird und anschließend ozonolytisch gespalten wird (Schema 39).



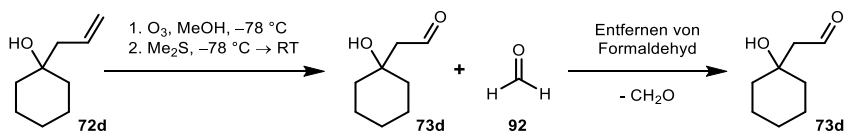
Schema 39. Versuche zur Synthese von (1*R*,3*S*)-Cyclopent-4-en-1,3-diol (**90**).

Versuche die Reduktion des Peroxids mit Thioharnstoff nach Literaturangaben durchzuführen, schlugen fehl.^[153] Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Reaktion abweichend von der Literatur in einem wesentlich kleineren Reaktionsansatz durchgeführt wurde. In der Literatur wurde das Peroxid in mehreren Teilreaktionen hergestellt und die vereinigten Reaktionsansätze reduktiv aufgearbeitet, wobei eine maximale Ausbeute von 28% erreicht werden konnte. Dimethylsulfid und Natriumborhydrid wurden alternativ als sanfte Reduktionsmittel getestet. Dünnschichtchromatographisch war jeweils die vollständige Umsetzung von Cyclopentadien zu einem Produkt erkennbar, wobei sich nach der Aufarbeitung das Diol **90** NMR-spektroskopisch jedoch nur in Spuren nachweisen ließ, sodass die Syntheseveruche als fehlgeschlagen betrachtet werden müssen. Weitere mögliche Reduktionsmittel wären Triphenylphosphin oder Lithiumaluminiumhydrid, welche hier jedoch nicht mehr getestet wurden, da die ineffiziente Isolierung des Produkts als Ursache vermutet wurde. Vertiefte Studien wurden daher zunächst zurückgestellt.

3.1.3.1 Versuche zum Entfernen von Formaldehyd

Bei der Ozonolyse von terminalen Olefinen muss beachtet werden, dass bei der Spaltung der C=C-Bindung zwei Aldehyde entstehen, wobei in den hier synthesestrategisch favorisierten Allylverbindungen je ein Äquivalent 3-Hydroxyaldehyd und Formaldehyd gebildet werden. Für die beabsichtigten Aldolreaktionen ist Letzterer jedoch ein wesentlich besseres Elektrophil als der jeweilige 3-Hydroxyaldehyd und konkurriert daher hocheffizient mit diesem bei FSA-katalysierten Reaktionen. Folglich ist es unabdingbar, dass bei FSA-katalysierten Reaktionen mehr Äquivalente an Donor zugesetzt werden, wenn Formaldehyd nicht vorab entfernt und das aus Formaldehyd resultierende Produkt abgetrennt wird.

Um bei den Enzymreaktionen nicht unnötig mehr Donor einzusetzen und um zu vermeiden, dass gebildete Nebenprodukte bei der Aufreinigung stören, wurden Versuche unternommen, um den Anteil an Formaldehyd zu verringern bzw. diesen vollständig zu entfernen. Der Siedepunkt von Formaldehyd liegt bei $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$, sodass es prinzipiell möglich ist, durch Anlegen eines Unterdrucks den Aldehyd zu entfernen. Formaldehyd ist jedoch so stark elektrophil, dass Wasser und Alkohole spontan unter Hydrat- bzw. Halbacetalbildung reagieren. In wässriger Lösung liegt Formaldehyd daher im Gleichgewicht mit seinem Hydrat vor, wobei das Gleichgewicht stark auf Seiten des Hydrats verschoben ist (99%). In Folge dessen sollte es einfacher sein, Formaldehyd aus nicht-wässrigen Lösungsmitteln wie beispielsweise Methanol oder nicht-protischen Solventien zu entfernen. Da tertiär substituierte 3-Hydroxyaldehyde jedoch nur begrenzt stabil gegen Eliminierung sind, wurden diverse Methoden zum Entfernen von Formaldehyd insbesondere bei niedrigen Temperaturen (25 und $40\text{ }^{\circ}\text{C}$) getestet. Die Methoden sollten erstens vom Testmaßstab her leicht auf größere Mengen übertragbar sein, zweitens in relativ kurzer Zeit durchführbar sein, drittens Formaldehyd nahezu quantitativ entfernen lassen ohne Verlust an 3-Hydroxyaldehyd und viertens keine unnötig hohen Mengen an zusätzlichen Lösungsmitteln verbrauchen. Verfahrenstechnisch wurden deshalb Kryotransfer, Gefrier-/Tauzyklen, Codestillation mit Methanol und Entgasen mit Argon getestet. Exemplarisch wurde 1-Allylcyclohexan-1-ol (**72d**) per Ozonolyse zum Aldehyd **73d** umgesetzt, wobei eine 100 mM-Lösung für Testzwecke erstellt wurde.



Schema 40. Ozonolyse von 1-Allylcyclohexan-1-ol (**72d**) und anschließende Versuche zum Entfernen von Formaldehyd (**92**) aus der Reaktionslösung.

Für den Kryotransfer (Kälteedestillation) wurde ein Rundkolben mit der methanolischen Reaktionslösung konstant auf $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten (Wasserbad) und über eine Destillationsbrücke mit einem Schlenkrundkolben verbunden, welcher konstant auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Isopropanol/Trockeneis) gekühlt wurde. nach Anlegen eines statischen Vakuums wurde gewartet, bis sich das Volumen der Reaktionslösung auf die Hälfte verringert hatte. Bei dieser Methode trat sehr schnell das Problem auf, dass es bei Einstellung des Vakuums zu abrupten Siedeverzügen kam, die sich auch durch Feinjustierung nicht kontrollieren ließen. Diese Verfahrensweise wurde daher verworfen, da unkontrollierbare Siedeverzüge insbesondere bei größeren Reaktionsansätzen ein schwer kalkulierbares Risiko gegeben wäre. Der Einsatz von Siedekapillaren könnte hier eventuell Abhilfe verschaffen, wobei einerseits im dynamischen Vakuum gearbeitet werden müsste und andererseits sichergestellt werden müsste, dass keine Luftfeuchtigkeit in die Reaktionslösung kondensiert wird.

Als zweite Methode wurde versucht, Formaldehyd sukzessiv über Gefrier-/Tauzyklen zu entfernen. Hierbei wurde die Reaktionslösung aus der Ozonolyse mit flüssigem Stickstoff eingefroren, dann Vakuum angelegt (1.5 mbar) und gewartet, bis die Lösung zu tauen anfang. Zur Kontrolle auf erfolgreiches Entfernen von Formaldehyd wurden nach jeweils zwei Zyklen HPLC-Proben analysiert, wobei zusätzlich Hydroxyaceton als interner Standard zugegeben wurde (Sdp.(HA) = 147 °C). Über 16 Zyklen wurde jedoch keine signifikante Abnahme des Formaldehydgehalts beobachtet (Abbildung 9), während die Konzentration des 3-Hydroxyaldehyds **72d** in Relation zum internen Standard ebenfalls konstant blieb.

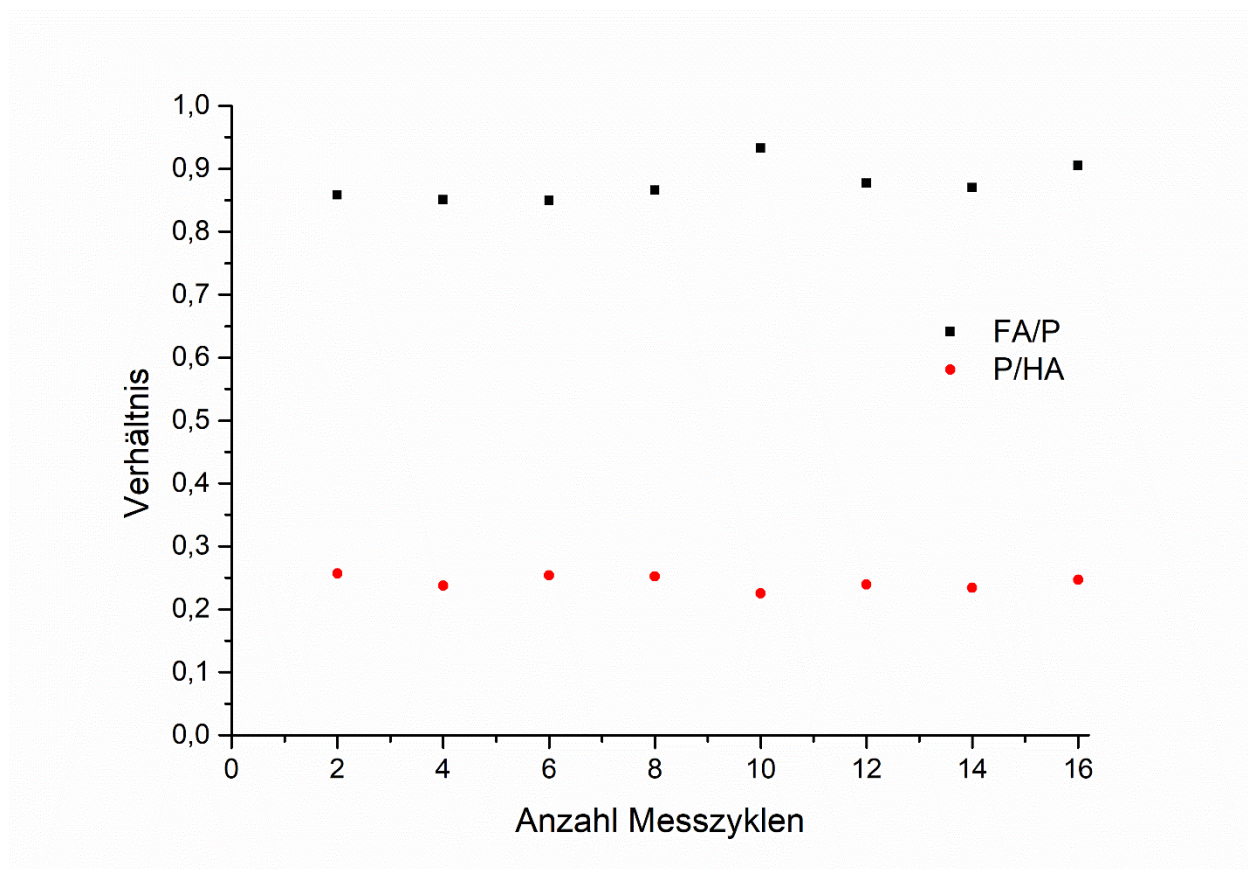


Abbildung 9. Gefrier-/Tau-Zyklen zum Entfernen von Formaldehyd. Schwarz: Verhältnis von Formaldehyd (FA) zum 3-Hydroxyaldehyd **73d** (P). Rot: Verhältnis des 3-Hydroxyaldehyds **73d** (P) zu Hydroxyaceton (HA, interner Standard).

Als dritte Methode wurde versucht, Formaldehyd durch Codestillation mit Methanol zu entfernen. Hierbei wurde zuerst die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bei 25 °C (30 mbar) jeweils auf die Hälfte des Startvolumens eingengt und danach jeweils auf das Startvolumen mit trockenem Methanol aufgefüllt. Nach jedem Einengen wurden HPLC-Proben mit internem Standard (Hydroxyaceton) analysiert. Im Vergleich zum Gefrier-/Tauzyklus war hier tatsächlich eine kontinuierliche Abnahme an Formaldehyd zu erkennen (Abbildung 10).

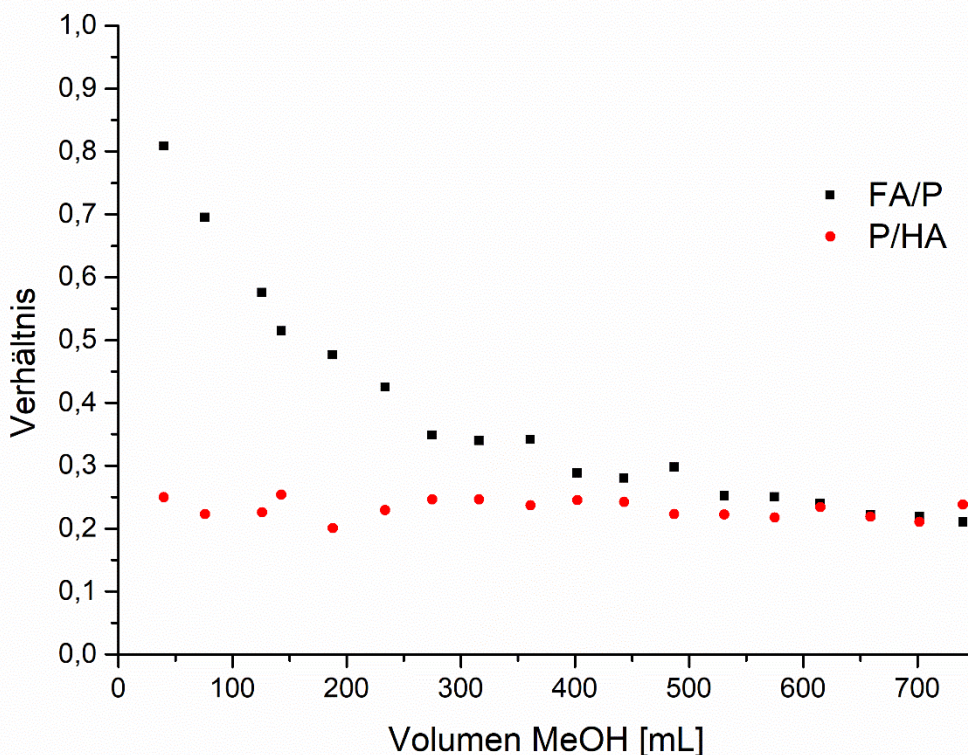


Abbildung 10. Codestillation mit Methanol zum Entfernen von Formaldehyd bei 25 °C (ab 275 mL 40 °C). Schwarz: Verhältnis von Formaldehyd (FA) zum 3-Hydroxyaldehyd **73d** (P). Rot: Verhältnis des 3-Hydroxyaldehyds **73d** (P) zu Hydroxyacetone (HA, interner Standard).

Nach sechs Zyklen und einem Verbrauch von ca. 230 mL Methanol lag das Verhältnis von Formaldehyd zu 3-Hydroxyaldehyd bei etwa 1.0 zu 2.5, ohne relevante Änderung der Konzentration des 3-Hydroxyaldehyds **73d**. Darauf aufbauend wurde die Reaktionslösung ab dem siebten Zyklus analog bei 40 °C (200 mbar) evaporiert, wobei hier keine weitere ähnlich rapide Abnahme von Formaldehyd mehr beobachtet wurde. Nach zwölf Zyklen lag Formaldehyd immer noch in einem Verhältnis von 1 zu 5 zum Substrat **73d** vor. Die erhöhte Temperatur hatte zudem keinen markanten Einfluss auf die Stabilität des Substrats. Insgesamt wurden hierbei allerdings 500 mL Methanol für 30 mL Reaktionslösung verbraucht. Bei einem Verbrauch von bis zu 750 mL Methanol auf 30 mL Startvolumen, was einem 25-fachen Lösungsmittelüberschuss bedeutet, erschien diese Methode für größere Reaktionsmengen nicht rentabel.

Als Letztes wurde die Reaktionslösung mit Argon durchströmt. Alle 30 Minuten wurde eine HPLC-Probe analysiert. Fünf Stunden lang wurde die Temperatur auf 25 °C gehalten, danach auf 40 °C erhöht. Nach zehn Stunden war eine moderate Abnahme von Formaldehyd zu erkennen, wobei das Verhältnis auf etwa 1 zu 1.25 sinkt (Abbildung 11). Eine Erhöhung der Temperatur hatte keinen merkbaren Einfluss auf die Geschwindigkeit der Abnahme an Formaldehyd.

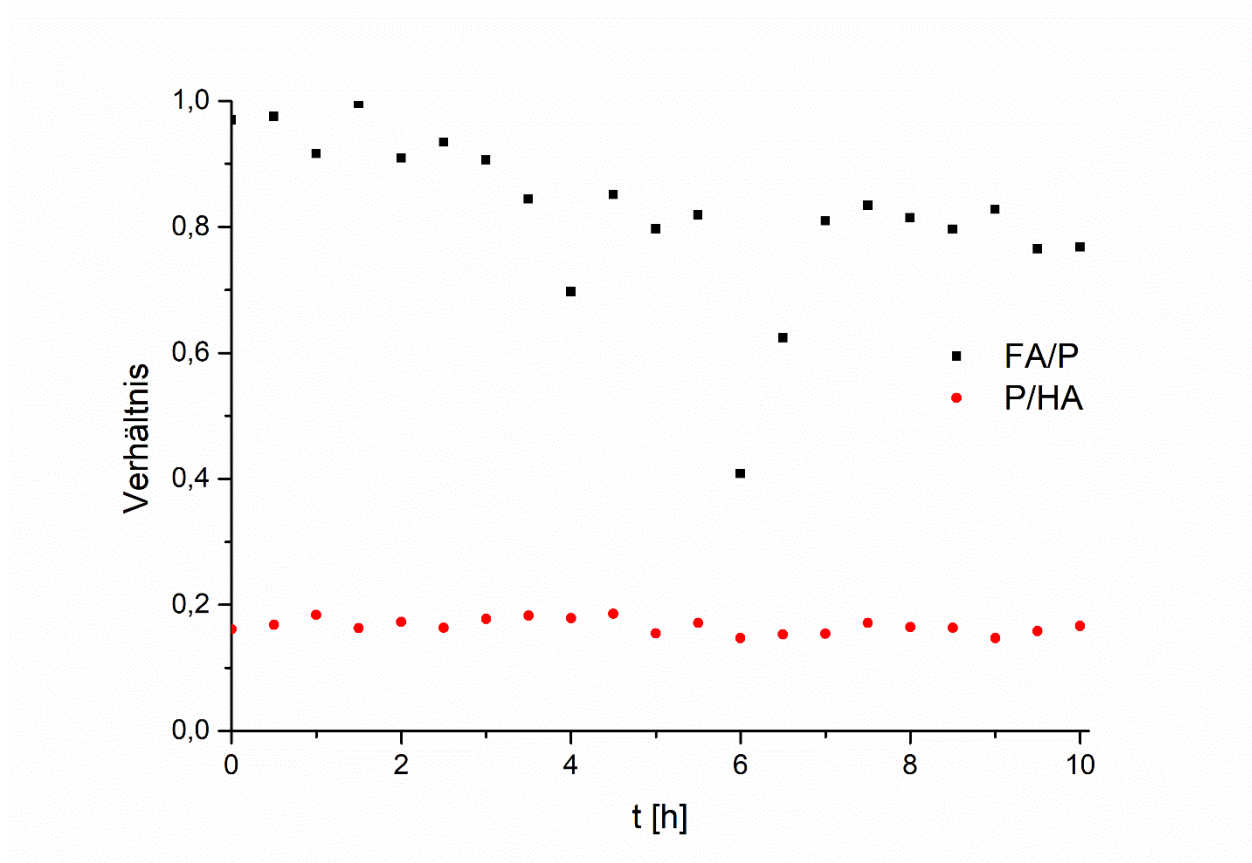


Abbildung 11. Entgasen mit Argon zum Entfernen von Formaldehyd. Schwarz: Verhältnis von Formaldehyd (FA) zum 3-Hydroxyaldehyd **73d** (P). Rot: Verhältnis des 3-Hydroxyaldehyds **73d** (P) zu Hydroxyacetone (HA, interner Standard).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei einem direkten Vergleich der Methoden zum Entfernen von Formaldehyd die Codestillation mit Methanol am geeignetsten erscheint. Deren Anwendung ist jedoch dadurch eingeschränkt, dass im ersten Test ein mindestens 7-facher Volumenüberschuss an Methanol nötig war, um Formaldehyd auf einen Anteil von 40% zu senken. Die Methode ist vergleichsweise schnell, kann jedoch selbst bei höheren Temperaturen (40 °C) keine vollständige Entfernung des Formaldehyds erreichen, obwohl dies theoretisch möglich sein sollte. Die Kryodestillation erwies sich wegen unkontrollierbarer Siedeverzüge als nicht verlässlich. Bei den Gefrier-/Tauzyklen wurde keine Abnahme an Formaldehyd beobachtet und das Entgasen mit Argon erwies sich sowohl als zeitaufwändig als auch ineffizient, da der Anteil an Formaldehyd über zehn Stunden nur um etwa 20% abnahm.

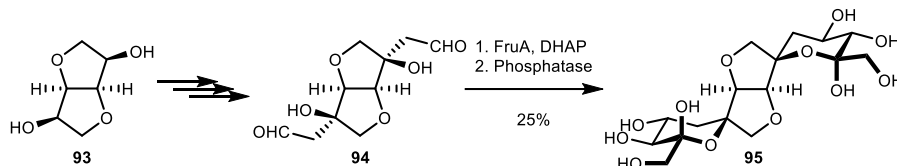
Da alle vier Methoden die am Anfang gestellten Anforderungen (Zeitbedarf, quantitatives Entfernen von Formaldehyd und Wirtschaftlichkeit) nicht erfüllten, wurden bei allen folgenden präparativen Ozonolysen zunächst darauf verzichtet, Formaldehyd zu entfernen. Als Folge dessen wurde bei den FSA-katalysierten Reaktionen kompensatorisch mit einer doppelten Menge an Donor gearbeitet.

3.1.4 Synthesen polyzyklischer Hydroxyaldehyde

Bei der Auswahl an polyzyklischen Diketonen, welche als Grundstruktur zur Synthese von Bis-(3-hydroxyaldehyden) dienen sollten, musste die Voraussetzung erfüllt sein, dass diese C_2 - oder C_{2v} -symmetrisch sind. Zusätzlich benötigen die Bizeyklen eine gewisse sterische Konvexität, sodass bei den Allylierungsreaktionen

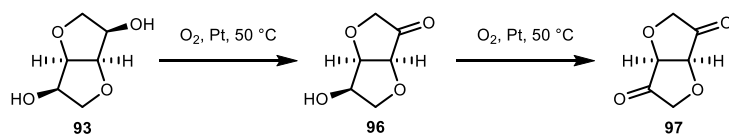
bevorzugt symmetrische Bis-(3-hydroxyaldehyde) gebildet werden können. Dies hat den Hintergrund, dass die gebildeten Reaktionsprodukte in den FSA-katalysierten Reaktionen ebenfalls C_2 - oder C_{2v} -symmetrisch sein würden, was die NMR-spektroskopische Analytik deutlich erleichtern sollte.

Kommerziell erhältliches 1,4:3,6-Dianhydro-D-mannitol (D-Isomannitol, **93**) wurde als bizyklischer Vorläufer für die Synthese komplexer bizyklischer Spirozucker in Betracht gezogen. Das daraus abgeleitete Dialdehydderivat **94** wurde bereits als Substrat in FruA-katalysierten Aldolreaktionen mit DHAP verwendet und war daher auch als Testsubstanz für FSA-katalysierte Reaktionen interessant (Schema 41).^[109]



Schema 41. Tandemartige FruA-katalysierte Umsetzung des auf D-Isomannitol (**93**) basierten Dialdehyds (**94**).^[109]

Nach HEYNES *et al.* kann D-Isomannitol (**93**) nahezu quantitativ an beiden Hydroxygruppen mit Sauerstoff am Platinkontakt zum symmetrischen Diketon **97** oxidiert werden (Schema 42).^[154]



Schema 42. Sequenzielle Oxidation von D-Isomannitol (**93**).^[154]

Der Platinkatalysator wurde vor der Reaktion durch Hydrierung von $PtO_2 \cdot H_2O$ frisch hergestellt. Versuche zur Reproduktion der Literaturergebnisse zeigten keinen vollständigen Umsatz, eventuell weil abweichend von der Literatur mit einem statischen Volumen an Sauerstoff mittels eines Ballons gearbeitet wurde. Die Oxidation erfolgt sequenziell, wobei zuerst das Monoketon **96** und dann das Diketon **97** gebildet werden. Da sich das Zwischen- und das Endprodukt wegen ähnlicher Polaritäten dünn-schichtchromatographisch nur schwer voneinander unterscheiden ließen, wurden der Reaktion nach 40, 136 und 160 Stunden Proben entnommen und diese NMR-spektroskopisch analysiert (Abbildung 12).

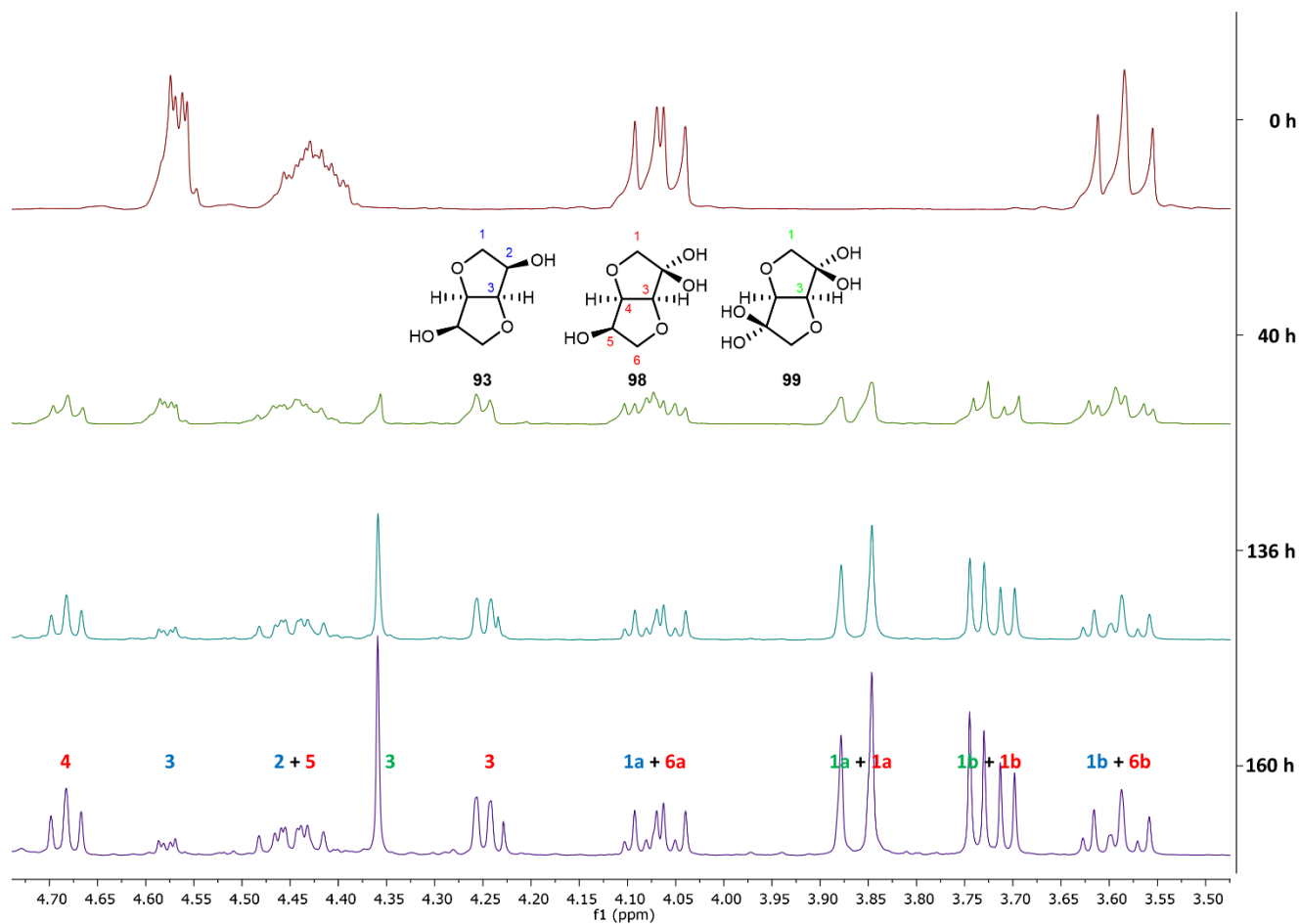


Abbildung 12. ^1H -NMR-spektroskopische Verfolgung (300.1 MHz, D_2O) der Oxidation von D-Isomannitol (**93**) während 160 Stunden Reaktionsdauer. Die Ketone liegen in Lösung jeweils weitgehend als Hydrat vor.

Die Integrale der Signale der jeweiligen Komponente (D-Isomannitol (**93**)): $\delta = 4.58$ ppm (m, 2H, H-3), Monoketon **96** als Hydrat: $\delta = 4.68$ ppm (d, 2H, H-4), Diketon **97** als Hydrat: $\delta = 4.35$ (s, 2H, H-3)) wurden normiert und im zeitlichen Verlauf aufgetragen (Abbildung 13).

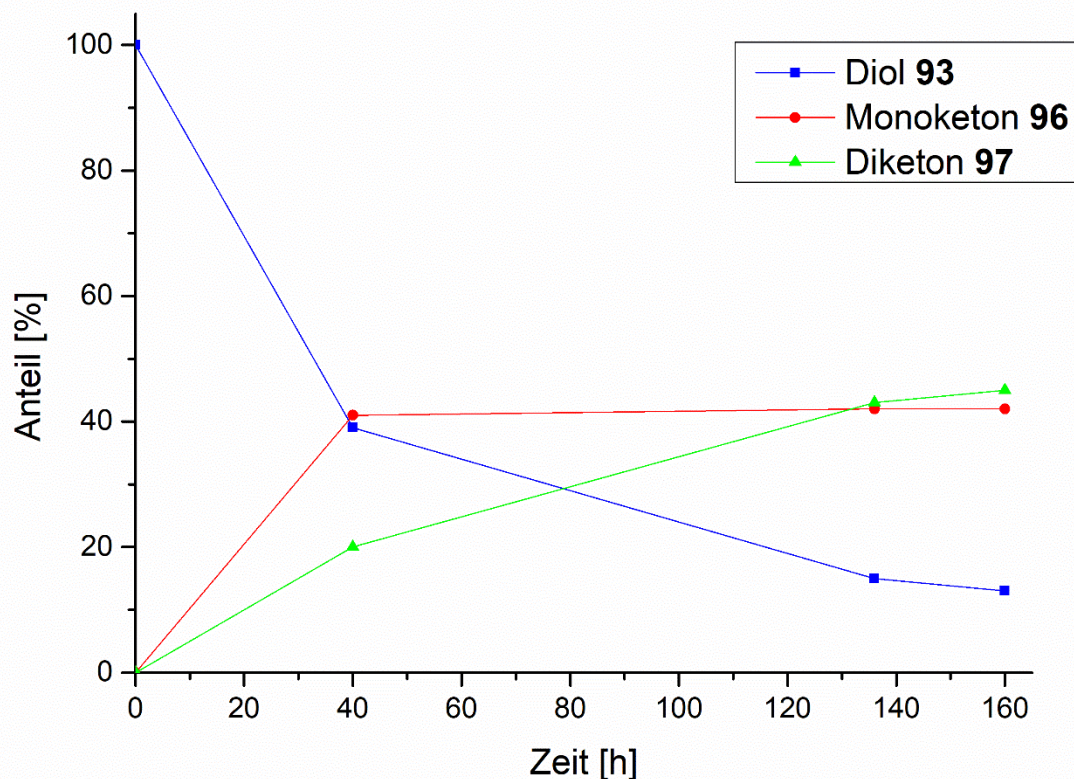
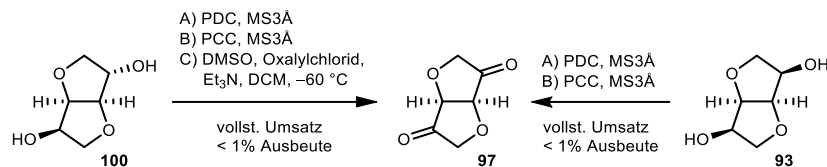


Abbildung 13. Prozentualer Anteil von D-Isomannitol (**93**), Monoketon **96** und Diketon **97** während 160 Stunden Reaktionsdauer.

Es ist zu erkennen, dass nach 40 Stunden der Anteil des Startmaterials **93** auf etwa 40% gesunken ist. Nach dieser Zeit wurde das Diketon **97** nur zu 20% gebildet, weshalb die Reaktion weitere 120 Stunden durchgeführt wurde, woraufhin die Menge an Startmaterial unter 15% sank, während der Anteil an Diketon auf 45% anwuchs, aber das Monoketon **96** bei 40% Anteil konstant blieb. Als Ursache für den unvollständigen Umsatz kann eine zu geringe Menge an Platinkatalysator ausgeschlossen werden, da hier 54 Gew.-% Platin verwendet wurden, während in der Literatur 33 Gew.-% Platin eingesetzt wurden.^[154] Es besteht die Möglichkeit, dass das Platin während der Reaktion wieder zu Platin(IV)oxid oxidiert wurde, sodass die katalytische Leistung mit der Zeit abnahm (zwischen 136 und 160 Stunden Reaktionszeit war keine merkliche Änderung mehr zu beobachten). Versuche analog zur Literaturvorschrift mit einem konstanten Sauerstoffstrom zu arbeiten, führten zu ähnlichen Ergebnissen, wobei der Umsatz an D-Isomannitol (**93**) auf diese Weise nur etwas gesteigert werden konnte. Abweichend zur Versuchsvorschrift nach HEYNES wurde keine Schüttelente verwendet, sodass keine ausreichende Durchmischung der Lösung mit Sauerstoff gewährleistet wurde und folglich die Reaktionszeit zugenommen hat. LIMBERG *et al.* beobachteten bei kurzen Reaktionszeiten (6 h) ebenfalls eine unvollständige Oxidation von D-Isomannitol (**93**), begründen diesen Umstand jedoch nicht.^[155] Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass der Katalysator während des Reaktionsverlaufs vergiftet wurde, sodass keine katalytische Oxidation mehr stattfinden konnte. Um diese Hypothese zu prüfen, hätte nach gewissen Zeitabständen Platin erneut zur Reaktion zugegeben werden können, was hier jedoch nicht weiterverfolgt wurde.

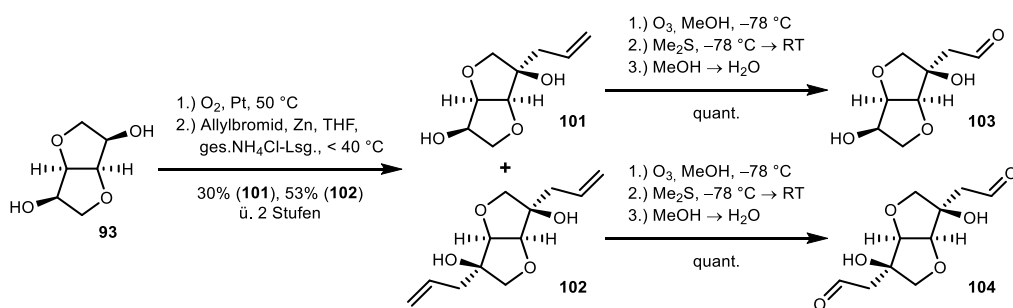
Als alternative Oxidationsmittel wurden Pyridiniumdichromat^[155] und Pyridiniumchlorochromat^[150] in Erwägung gezogen, um D-Isomannitol (**93**) bzw. alternativ D-Isosorbitol (**100**) zum Diketon **97** umzusetzen.



Schema 43. Oxidationsversuche von D-Isosorbitol (**100**) mittels Pyridiniumdichromat (PDC), Pyridiniumchlorochromat (PCC) oder Swern-Oxidation sowie D-Isomannitol (**93**) mittels PDC und PCC.^[150,155]

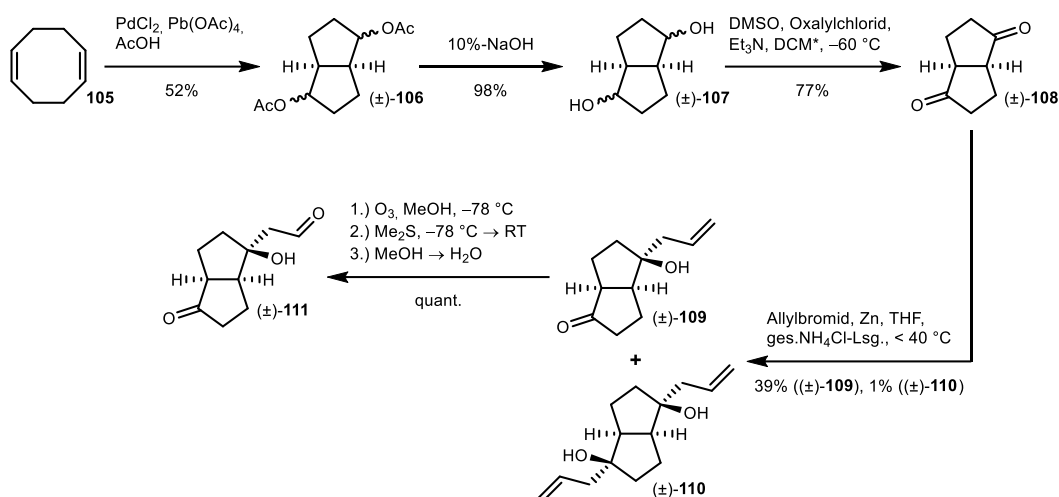
Obwohl die Reaktion jedes Mal unter vollständigem Umsatz des Startmaterials verlief, konnte das Zielprodukt jeweils nur in sehr geringen Mengen isoliert werden (Schema 43). Eine Oxidation von D-Isosorbitol (**100**) unter Swern-Bedingungen^[156] zeigte ebenfalls vollständigen Umsatz auf, wobei das Zielprodukt wiederum nicht isoliert werden konnte. NMR-spektroskopisch wurde beobachtet, dass das Diketon im wässrigen Milieu hauptsächlich als Hydrat vorliegt. Da Letzteres über vier Hydroxygruppen und sechs Sauerstoffatome im Molekül verfügt, ist dieses aufgrund seiner Polarität sehr stark wasserlöslich. Dieser Umstand kann erklären, warum sich das Produkt nicht zufriedenstellend isolieren ließ. Da angenommen wurde, dass das Diketon **97** aufgrund seiner Polarität schwierig zu isolieren war, wurde zusätzlich versucht D-Isosorbitol (**100**) zuerst unter Swern-Bedingungen zu oxidieren und das Zwischenprodukt direkt *in situ* unter Barbier-Bedingungen zu allylieren, was jedoch gescheitert ist.

Da sich in der Oxidation mit Sauerstoff und Platin das einfach oxidierte Produkt nicht vom Zielprodukt zufriedenstellend trennen ließ, wurde das Reaktionsgemisch nach beendeter Reaktion direkt unter Barbier-Bedingungen allyliert, wobei das Allylladdukt **101** ausgehend vom Monoketon **96** in 30% Ausbeute und das Diallylladdukt **102** des Diketons **97** in 53% Ausbeute erhalten werden konnten (Schema 44). Bei beiden Komponenten wurde eine vollständige Stereokontrolle der Addition vom konvexen Halbraum her erreicht. Beide Verbindungen wurden durch Ozonolyse quantitativ in die jeweiligen 3-Hydroxyaldehyde **103** und **104** überführt.



Schema 44. Dreistufensynthese der D-Isomannitol-basierten 3-Hydroxyaldehyde **103** und **104**.

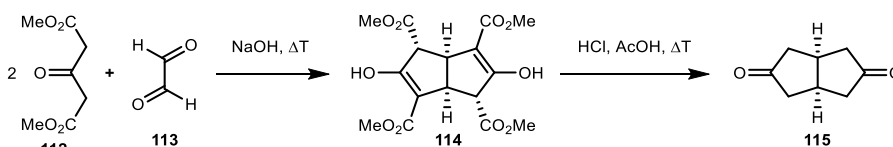
Als konstituiertes Analogon zu D-Isomannitol (**93**) wurde das carbobizyklische Diketon (\pm)-**108** synthetisiert, welches dann über zwei Stufen zum 3-Hydroxyaldehyd umgesetzt werden sollte (Schema 45).



Schema 45. Synthese von 2-((1S,3aS,6aS)-1-Hydroxy-4-oxooctahydropentalen-1-yl)acetaldehyde ((±)-111).

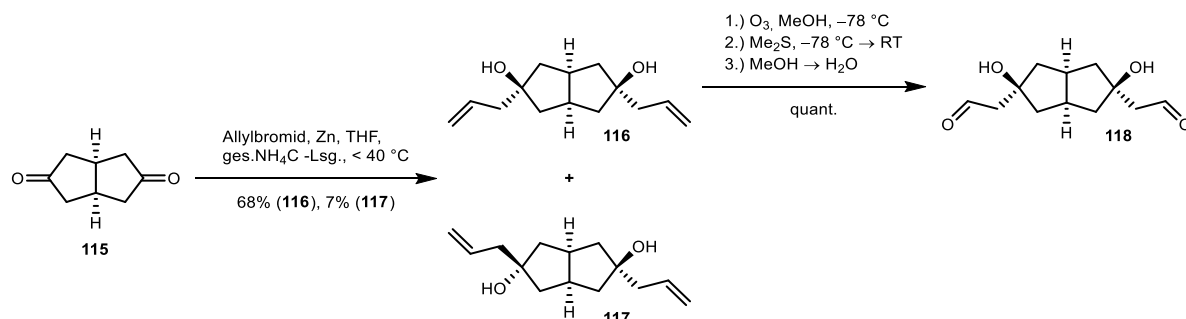
Hierzu wurde zunächst 1,5-Cyclooctadien (**105**) mittels Palladium(II)chlorid und Bleitetraacetat in 52% Ausbeute zum Bicyklus (**(±)-106**) umgesetzt.^[157] Die Acetylgruppen wurden durch Behandlung im Basischen geschützt (98% Ausbeute mit Natriumhydroxid).^[158] Swern-Oxidation des Diols (**(±)-107**) lieferte das racemische Diketon (**(±)-108**) in 82% Ausbeute,^[156] nachdem sich die Oxidation mittels Jones'-Reagenz nicht reproduzieren ließ.^[158] Oxidation mit Pyridiniumchlorochromat schlug ebenfalls fehl.^[159] Entgegen aller Erwartungen konnte bei der Allylierung im Gegensatz zum D-Isomannitol-basierten Diketon **97** kein vollständiger Umsatz zum Diallyladdukt erreicht werden. Ein Erhöhen der Anteile an Allylbromid und Zink bewirkte keine Verbesserung der Ausbeute. Es wurde nur das einfach-allylierte Produkt (**(±)-109**) mit 39% Ausbeute und die Diallylverbindung (**(±)-110**) mit 1% Ausbeute erhalten. Aufgrund der geringen absoluten Ausbeute des Diallyladdukts wurde dieses nicht weiter umgesetzt. Eine mögliche Ursache dafür, dass hauptsächlich das Monoallyladdukt (**(±)-109**) gegenüber dem Bisallyladdukt (**(±)-110**) gebildet wird, könnte darin liegen, dass der Angriff des Allylnukleophils von der konvexen Seite her durch das Brückenproton in α -Position zur Carbonylgruppe erschwert ist. Ungewiss ist, ob die Hydroxygruppe, welche nach einer einfachen Addition gebildet wird, eine Abnahme der Elektrophilie des zweiten Carbonyls bewirkt, wodurch hypothetisch zusätzlich das geringere Auftreten der zweiten Addition zu erklären wäre. Prinzipiell lässt sich die Reaktion auch mit anderen Metallen, wie beispielsweise Indium, oder unter Grignard-Bedingungen durchführen. Aufgrund des relativ unpolaren Charakters des Diketons könnten bei einer Grignard-Reaktion sowohl höheren Ausbeute als auch eine zweifachen Allylierung erreicht werden, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt wurde. Das Monoallyladdukt (**(±)-109**) wurde per Ozonolyse direkt in den 3-Hydroxyaldehyd (**(±)-111**) überführt.

Analog zum Bicyclo[3.3.0]octan-2,6-dion ((**(±)-108**)) wurde das regioisomere C_{2v} -symmetrische Bicyclo[3.3.0]octan-3,7-dion (**115**) eingesetzt. Das Diketon **115** kann durch doppelte Kondensation von 3-Oxopentandisäuredimethylester (**112**) mit Glyoxal (**113**) und anschließender saurer Esterhydrolyse mit Decarboxylierung erhalten werden.^[160]



Schema 46. Literatursynthese von (3aS,6aS)-Tetrahydropentalen-2,5(1H,3H)-dion (**115**).^[160]

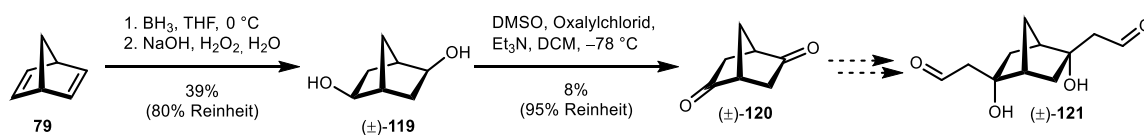
Durch Allylierung des Diketons **115** wurde das doppelte *cis*-Allyladdukt **116** in 68% Ausbeute und die *trans*-Isomer **117** in 7% Ausbeute erhalten. Das Startsubstrat liegt in Briefumschlagskonformation vor, sodass ein nukleophiler Angriff von der konvexen Seite kinetisch begünstigt ist, was erklärt, warum die *cis*-Verbindung **117** bevorzugt gebildet wird (Schema 47).



Schema 47. Synthese des *cis*-Bis-(3-hydroxyaldehyds) **118** ausgehend vom Tetrahydropentalen-2,5-dion (**115**).

Das Produkt aus einem beidseitigen konkaven Angriff des Allylnukleophils wurde nicht beobachtet. Im Vergleich zum Bicyclo[3.3.0]octan-2,6-dion (\pm)-**108** erfolgte hier ein vollständiger Angriff an beiden Carbonylgruppen, was vermutlich auf sterische Faktoren zurückzuführen ist, da die Ketone leichter zugänglich sind. Das *cis*-Allyladdukt konnte durch Ozonolyse in den doppelten 3-Hydroxyaldehyd **118** überführt werden, während das *trans*-Allylprodukt wegen der begrenzten Substanzmenge nicht weiterverfolgt wurde.

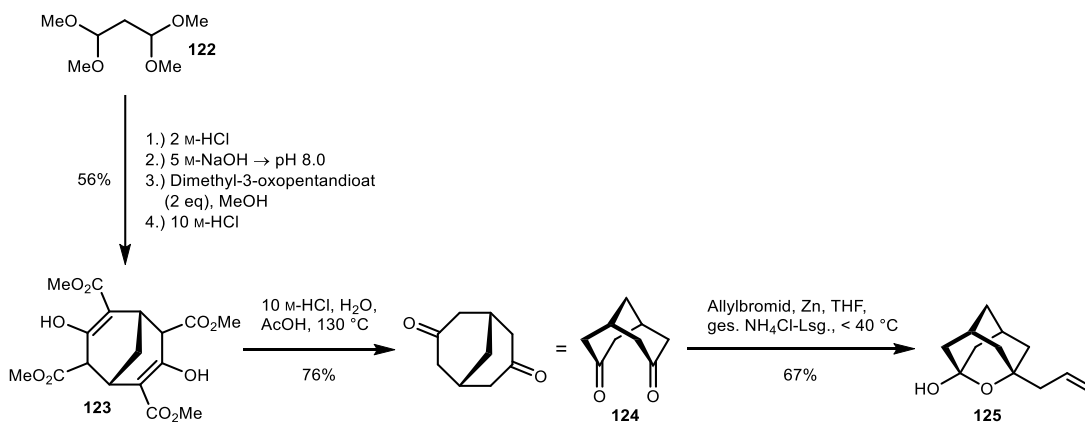
Bicyclo[2.2.1]heptan-2,5-dion (\pm)-**120** wurde als verbrücktes Analogon zu Cyclohexa-1,4-dion (**74**) ausgewählt, aus dem mittels Allylierung und Ozonolyse der Bis-(3-hydroxyaldehyd) (\pm)-**121** erreichbar schien. Das Dion (\pm)-**120** wurde ausgehend von Norbornadien (**79**) synthetisiert (Schema 48), wofür Norbornadien (**79**) durch Hydroborierung und anschließender Behandlung mit Wasserstoffperoxid im Basischen regioselektiv zum C₂-symmetrischen Diol (\pm)-**119** in 39% Ausbeute umgesetzt wurde,^[161] wobei die Reinheit nicht über 80% gesteigert werden konnte. Unabhängig davon wurde das so erhaltene Rohprodukt einer Swern-Oxidation unterworfen,^[162] wobei das Diketone (\pm)-**120** jedoch nur in einer Ausbeute von unter 8% erhalten werden konnte. Der Reinheitsgrad des Diketons (\pm)-**120** von 95% ließ sich durch Umkristallisation, Kugelrohrdestillation oder Säulenchromatographie nicht steigern. Wegen der Probleme aus unzureichender Reinheit und der schlechten Ausbeute im zweiten Reaktionsschritt wurden Folgereaktionen auf dieser Route zunächst zurückgestellt.



Schema 48. Zweistufensynthese von Bicyclo[2.2.1]heptan-2,5-dion (\pm)-**120**.

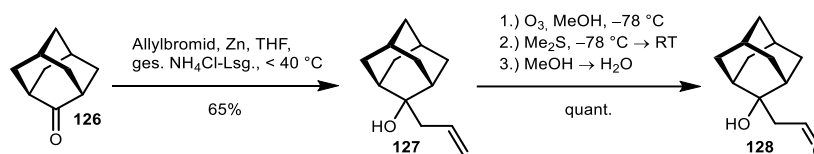
Bicyclo[3.3.1]nonan-3,7-dion (**124**) wurde aufgrund seines bicyklischen Gerüsts als weiteres C_{2v}-symmetrisches Diketone zur Synthese von Bis-(3-hydroxyaldehyden) ausgewählt. Ausgehend von 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (**122**) wurde der Bicyklus **123** in 56% Ausbeute erhalten, welcher durch Decarboxylierung im Sauren das Diketone **124** in 76% Ausbeute lieferte (Schema 49).^[163] Die Allylierung erfolgte mit einer Ausbeute von 67%, führte aber nicht zum Diallyladdukt, da nach der ersten Allyladdition die entstandene Hydroxygruppe wegen der räumlichen Nähe zur zweiten Ketogruppe diese transannular angreifen und das stabile Halbacetal **125** ausbilden kann. Da bei einer Ozonolyse kein 3-Hydroxyaldehyd entstehen würde, wodurch eine

intramolekulare Zyklisierung des Produkts aus der FSA-katalysierten Reaktion praktisch ausgeschlossen war, wurde die Verbindung nicht weiterverwendet.



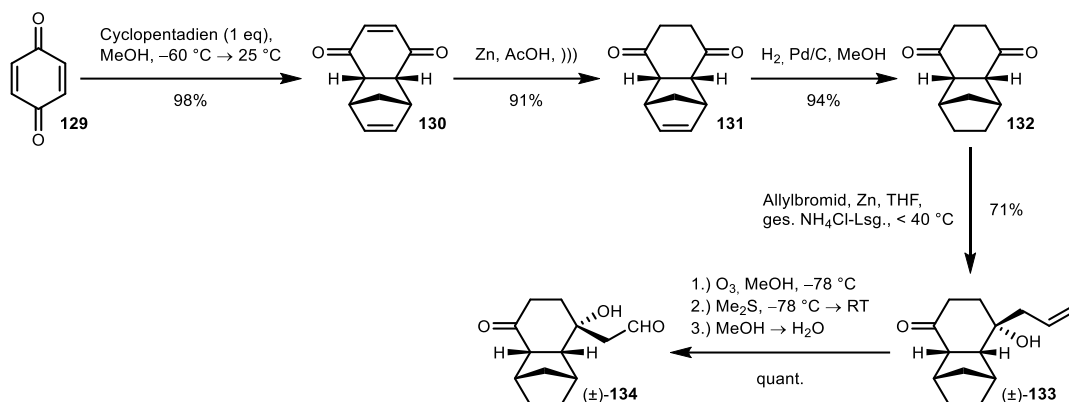
Schema 49. Synthese von 3-Allyl-2-oxaadamantan-1-ol (**125**).

Adamantanon (**126**) sollte als Grundlage für den entsprechenden 3-Hydroxyaldehyd **128** dienen, da dieser einen ähnlich hohen Raumanspruch wie das Diketon **124** aufweist. Unter Barbier-Bedingungen reagierte das Keton **126** mit 67% Ausbeute zum Addukt **127**. Bei der anschließenden Ozonolyse wurde das Startmaterial zwar vollständig verbraucht, jedoch zeigte sich, dass beim Aufwärmen der Reaktionslösung auf Raumtemperatur ein Großteil des Materials wegen der geringen Polarität ausfiel.



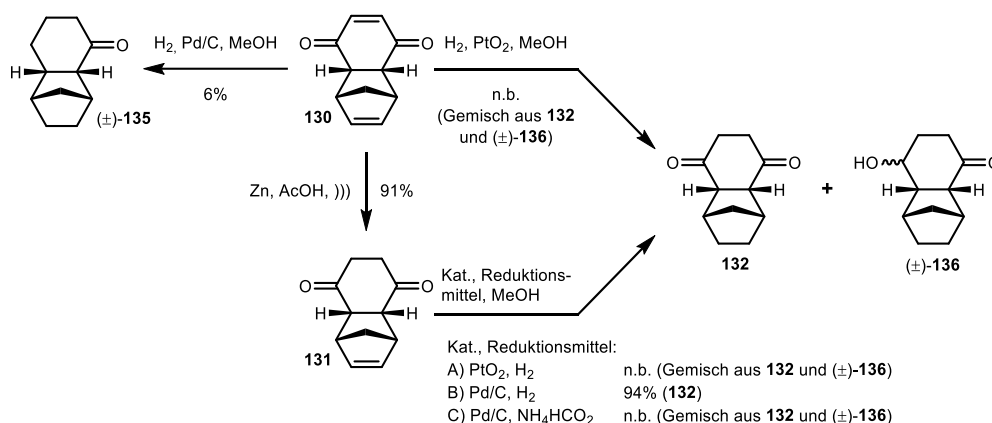
Schema 50. Synthese von 2-(2-Hydroxyadamantan-2-yl)acetaldehyd (**128**) ausgehend von Adamantanon (**126**).

Als weiteres trizyklisches Konstrukt wurde das Diketon **132** in drei Stufen hergestellt. Das aus *p*-Benzochinon mit einem Äquivalent Cyclopentadien in einer Diels-Alder-Reaktion in 98% Ausbeute^[164] erhältliche Endion **130** wurde selektiv durch Reduktion des konjugierten Olefins mit Zink in Eisessig und Ultraschallaktivierung in das Diketon **131** in 91% Ausbeute überführt.^[165] Die isolierte Doppelbindung wurde in 94% Ausbeute darauf mit Wasserstoff an Palladium reduziert. Die Allylierung führte entgegen der Erwartung nur zum Monoallylprodukt (\pm)-**133** in 71% Ausbeute, welches durch Ozonolyse quantitativ in den 3-Hydroxyaldehyd (\pm)-**134** überführbar war (Schema 51). Eine Zweifachallylierung wurde unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht beobachtet, vermutlich, weil die zweite Carbonylgruppe unter den Reaktionsbedingungen zumindest temporär durch Halbacetalbildung maskiert vorliegt.



Schema 51. Synthese des trizyklischen 3-Hydroxyaldehyds (±)-134.

Zusätzlich zu der gewählten Route wurden noch verschiedene alternative Verfahrensweisen bzw. -sequenzen zur Hydrierung des Endions **130** und des Dions **131** ausgetestet (Schema 52).



Schema 52. Versuche zur Hydrierung von Endion **130** und Dion **131**. n.b.: Nicht bestimmt.

Bei einer direkten Reduktion beider Alkene in **130** liegt der Vorteil darin, dass ein Reaktionsschritt eingespart werden kann. Bei den Reduktionsansätzen zeigte sich, dass ein vollständiger Umsatz beobachtet wird, wenn das Endion **130** mit Wasserstoff an Palladium reduziert wird. Zwar findet die Reduktion beider Alkengruppen statt, jedoch wird zusätzlich noch unerwartet eine der beiden Carbonylgruppen reduziert (Abbildung 14). Bei Reduktion beider Doppelbindungen sollte ein C₂-symmetrisches Molekül entstehen, für das sechs ¹³C-Signale zu beobachten wären; bei dem neu gebildeten Produkt wurden stattdessen 11 Kohlenstoffsignale beobachtet. Das ¹³C-DEPT-Spektrum weist darauf hin, dass das Molekül eine Carbonyl-, sechs CH₂- und vier CH-Gruppen besitzt, was für die Bildung des Monoketons (±)-**135** spricht.

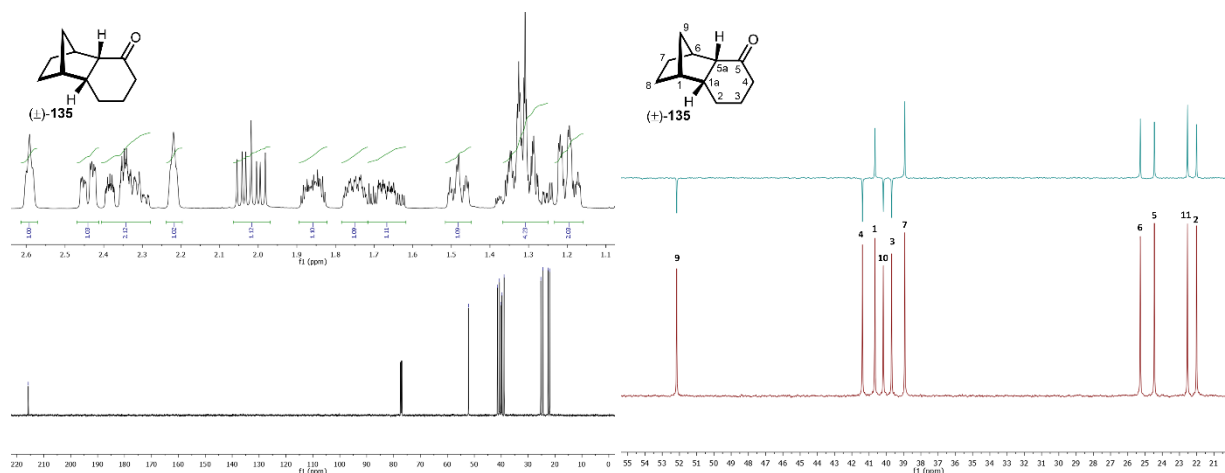


Abbildung 14. Links: ¹H- und ¹³C-NMR (500 MHz, 300 K, CDCl₃) von Keton (±)-135. Rechts: Vergrößerter Aliphatenbereich im ¹³C-DEPT- und ¹³C-NMR von Keton (±)-135.

Bei der Reduktion des Endions **130** mit Wasserstoff an Platin(IV)oxid wurden zwar ebenfalls beide Alkene reduziert, zusätzlich aber mit zunehmender Reaktionszeit auch eine der Ketogruppen zum Alkohol, wodurch ein Gemisch des Dions **130** und des Alkohols (±)-**136** erhalten wurde.

Insgesamt wurden für die Reduktion des Dions **131** verschiedene Verfahren getestet, für die die Ergebnisse in Tabelle 20 zusammengefasst sind.

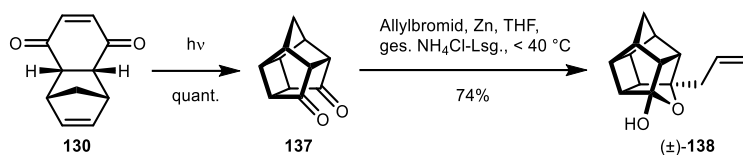
Tabelle 20. Reaktionsansätze zur Hydrierung von Dion **131**.

Katalysator	Reduktionsmittel	Reaktionszeit	Ausbeute	Reaktionsprodukte
PtO ₂	H ₂	19 h	n.b. ^b	132 und (±)- 136
Pd/C	H ₂	< 60 min	94%	132 ^c
Pd/C	NH ₄ HCO ₂ ^a	72 h	n.b. ^b	132 und (±)- 136

Reaktionsbedingungen: 1.15 mmol Dion **131**, 10 Gew.-% Katalysator, 15 mL MeOH, 25 °C; ^a10 eq NH₄HCO₂; ^bnicht bestimmt; ^cbei Reaktionszeiten über 60 min ist die Bildung des Alkohols (±)-**136** zu beobachten.

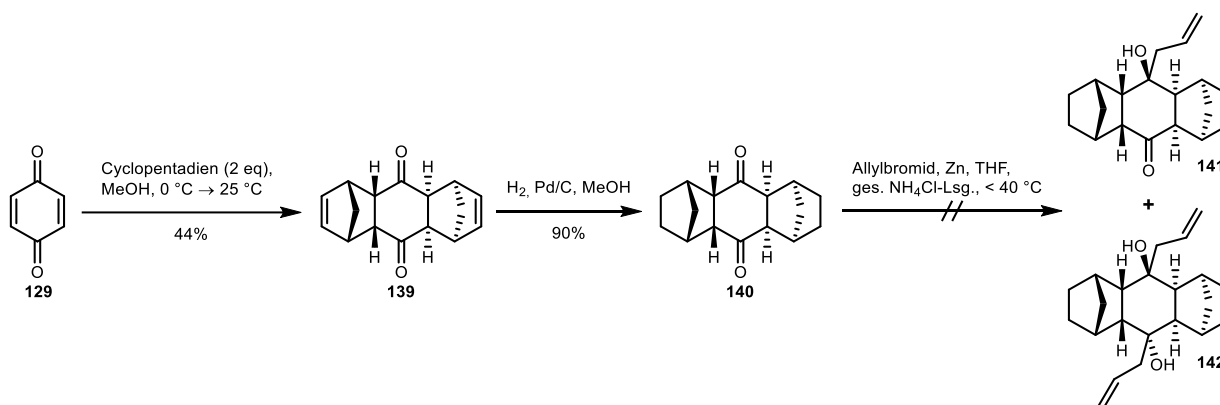
Bei der Reduktion unter Einsatz von Platin(IV)oxid zeigte sich analog zur Reaktion des Endions **130** eine fortschreitende Reduktion bis zum Alkohol (±)-**136**. Wird die Reaktion mit Wasserstoff an Palladium länger als 60 Minuten durchgeführt, so kann auch hier die Reduktion zum Alkohol (±)-**136** beobachtet werden. Es scheint, dass die Bildung der Reduktionsprodukte **132** und (±)-**136** bei der Reaktion nur dann unterdrückt werden kann, wenn die Hydrierung mit kurzer Reaktionsdauer durchgeführt wird. Die Reaktionskontrolle stellte sich als problematisch heraus, da die Edukte sich bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung kaum vom gewünschten Reduktionsprodukt unterschieden und so ein kontrollierter Reaktionsabbruch schwierig war. Zusätzlich wurde Ammoniumformiat als alternative Quelle für Wasserstoff getestet.^[166] Bei dieser Reduktion mit NH₄HCO₂ über Palladium wurde das Dion **131** vollständig umgesetzt, jedoch trat hier analog die Bildung beider reduzierten Spezies auf.

Das Dien **130** kann durch eine Photocyclisierung zum Diketon **137** umgesetzt werden (Schema 53).^[167] Bei der Allylierung war das gleiche Phänomen wie beim Bicyclo[3.3.1]nonan-3,7-dion (**124**) zu beobachten. Nach der ersten Addition wird intramolekular ein Halbacetal ausgebildet, welches in 74% Ausbeute erhalten wurde. Dadurch, dass kein 3-Hydroxyaldehyd entstanden ist, wurde die Reaktionsfolge hier abgebrochen.



Schema 53. Allylierung von Diketon (**137**) zum Halbacetal (\pm)-**138**.

Die Diels-Alder-Reaktion von *p*-Benzochinon **129** mit zwei Äquivalenten Cyclopentadien lieferte das Diketon **139** in 44% Ausbeute,^[168] welches mit Wasserstoff über Palladium in 90% Ausbeute reduziert wurde (Schema 53). Versuche einer Allylierung des Diketons **140** schlugen fehl, was vermutlich auf die geringe Löslichkeit des Substrats in THF und H₂O sowie sterische Hinderung zurückzuführen ist.

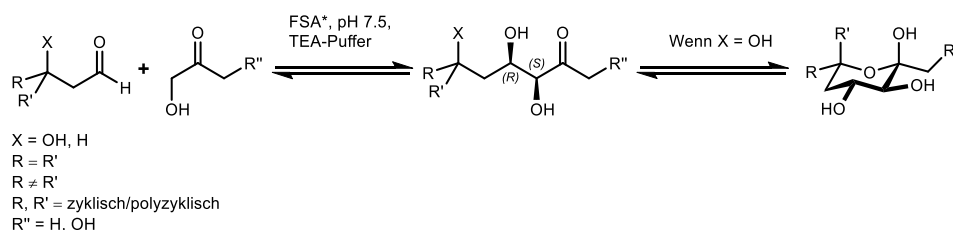


Schema 54. Synthese des Diketons **140** und Versuch der Allylierung nach Barbier.

3.2 FSA-katalysierte Synthesen von Desoxyzuckern

3.2.1 Substratscreening mit FSA^{wt} und FSA^{A129S}

Die in Kapitel 3.1 hergestellten Aldehyde wurden zuerst im analytischen Maßstab mit Hydroxyaceton oder Dihydroxyaceton unter Katalyse der jeweiligen FSA-Variante auf ihre Reaktionsfähigkeit mittels DC- und HPLC-Kontrolle untersucht (Schema 55). Sofern bei den Testansätzen neue Signale detektiert wurden, die auf eine Produktbildung schließen ließen, wurden die Reaktionen im präparativen Maßstab durchgeführt.



Schema 55. FSA-katalysierte Testreaktionen von Aldehyden.

Die getesteten Aldehyde lassen sich in fünf Kategorien unterteilen (Abbildung 15): 1. Lineare und monozyklische 3-Hydroxyaldehyde, 2. lineare Dialdehyde und Intermediate, 3. lineare 3-Hydroxyaldehyde, 4. monozyklische Bis-(3-hydroxyaldehyde) und 5. polyzyklische Mono- und Bis-(3-hydroxyaldehyde).

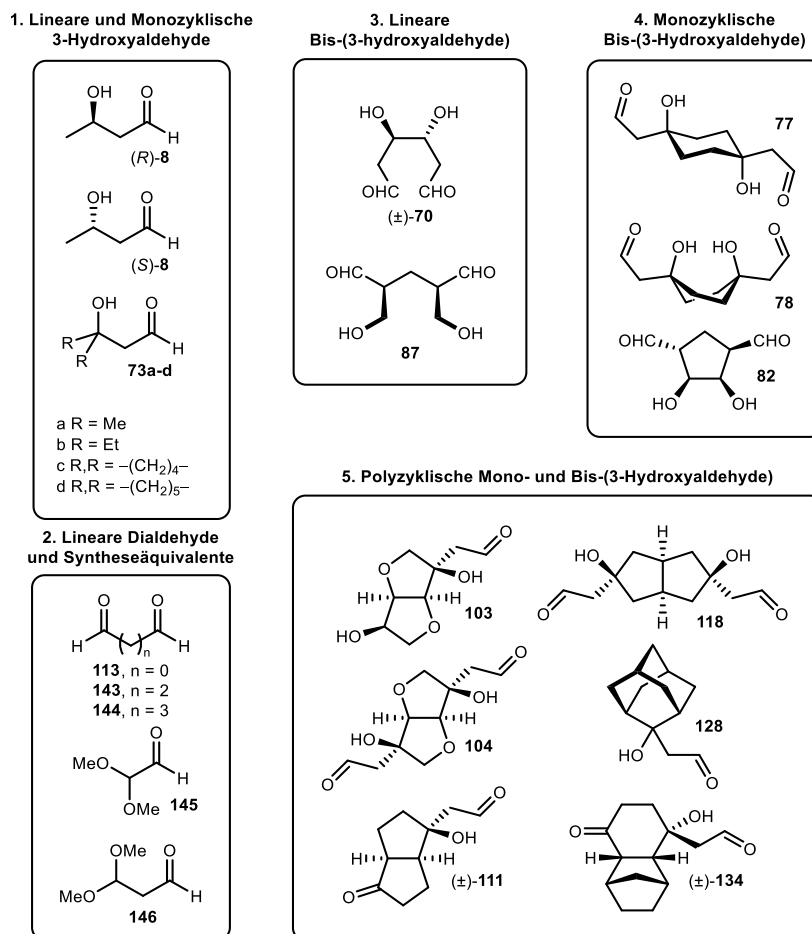


Abbildung 15. Untersuchte Aldehyde in FSA-katalysierten Testreaktionen.

Das Screening der Aldehyde wurde bis auf wenige Ausnahmen im Volumen von 500 μ L mit einer Substratmenge von 50 μ mol durchgeführt. Alle Reaktionen wurden mit Triethanolamin (TEA) bei pH 7.5 gepuffert und fanden bei 25 $^{\circ}$ C statt. Um eine nicht-enzymatische Synthese auszuschließen, wurden alle Reaktionen zur Kontrolle zusätzlich ohne Zugabe von Enzym getestet, wobei allerdings bei keinem der eingesetzten Substrate eine Produktbildung beobachtet wurde. Die Reaktionen wurden nach 0.5, 1, 2, 4, 6 und 24 Stunden dünnschichtchromatographisch analysiert. Nach 18, 24 und/oder 48 Stunden wurden zusätzlich HPLC-Proben vermessen. Die Ergebnisse des Substratscreenings sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21. Substratscreening verschiedener Aldehyde mit FSA^{wt} und FSA^{A129S} mittels Dünnschichtchromatographie (DC) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).

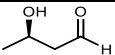
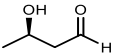
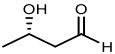
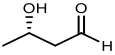
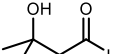
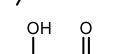
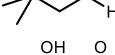
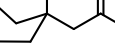
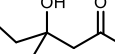
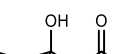
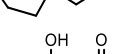
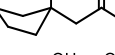
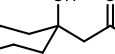
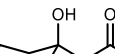
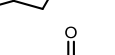
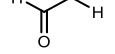
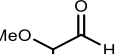
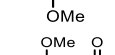
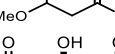
#	Akzeptor	C _{Akzeptor} [mM]	Donor	C _{Donor} [mM]	FSA*	DC ^b	HPLC ^c
1	 (R)-8	50	HA	150	wt	+	+
2	 (R)-8	50	DHA	150	A129S	+	+
3	 (S)-8	50	HA	150	wt	+	+
4	 (S)-8	50	DHA	150	A129S	+	+
5	 73a	<50 ^b	HA	150	wt	+	+
6	 73a	<50 ^b	DHA	150	A129S	+	+
7	 73b	<<50 ^b	HA	150	wt	+	+
8	 73b	<<50 ^b	DHA	150	A129S	+	+
9	 73c	<<50 ^b	HA	150 ^d	wt	+	+
10	 73c	<<50 ^b	DHA	150	A129S	+	+
11	 73d	<<50 ^b	HA	150 ^d	wt	+	+
12	 73d	<<50 ^b	DHA	150	A129S	+	+
13	 113	100	HA	600	wt	+	+
14	 145	50	HA	150	wt	–	–
15	 146	75	HA	225	wt	+	+
16	 147	50	HA	150	wt	–	–
17	 143	<<100	HA	600	wt	–	–
18	 144	100	HA	600 ^e	wt	+	+
19	 144	100	DHA	600 ^e	A129S	+	+

Tabelle 21. (fortgesetzt)

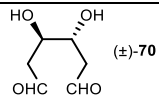
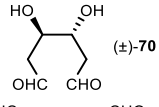
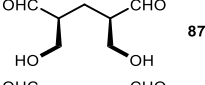
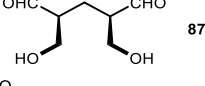
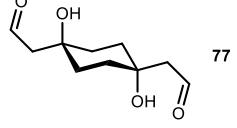
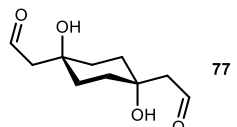
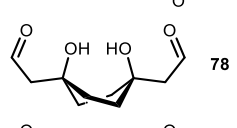
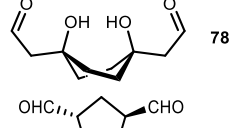
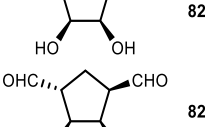
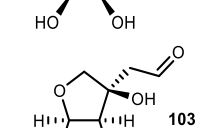
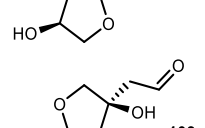
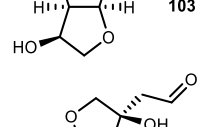
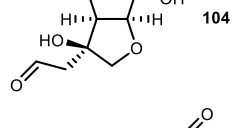
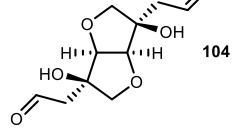
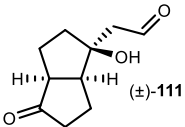
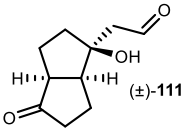
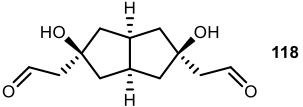
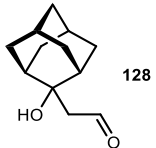
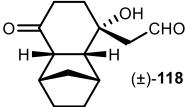
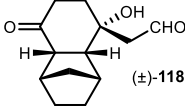
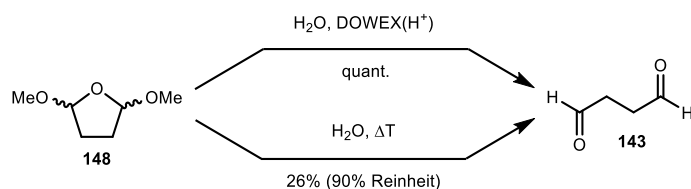
#	Akzeptor	C _{Akzeptor} [mM]	Donor	C _{Donor} [mM]	FSA*	DC ^b	HPLC ^c
20	 (±)-70	100	HA	600 ^e	wt	+	+
21	 (±)-70	100	DHA	600	A129S	–	–
22	 87	<<100 ^b	HA	300	wt	–	n.b. ^d
23	 87	<<100 ^b	DHA	300	A129S	–	–
24	 77	<<100 ^b	HA	300 ^d	wt	(+)	–
25	 77	<<100 ^b	DHA	300 ^d	A129S	–	–
26	 78	<<100 ^b	HA	300 ^d	wt	(+)	–
27	 78	<<100 ^b	DHA	300 ^d	A129S	–	–
28	 82	<<100 ^b	HA	300	wt	–	–
29	 82	<<100 ^b	DHA	300	A129S	–	–
30	 103	<<50 ^b	HA	200	wt	+	+
31	 103	<<50 ^b	DHA	200	A129S	–	–
32	 104	<<25 ^b	HA	100 ^e	wt	+	+
33	 104	<<25 ^b	DHA	100	A129S	–	–

Tabelle 21. (fortgesetzt)

#	Akzeptor	C _{Akzeptor} [mM]	Donor	C _{Donor} [mM]	FSA*	DC ^b	HPLC ^c
34		<<50 ^b	HA	200	wt	+	+
35		<<50 ^b	DHA	200	A129S	–	–
36		<<100 ^b	HA	300	wt	–	n.b. ^f
37		<<100 ^b	HA	1000	wt	–	n.b. ^f
38		<<50 ^b	HA	100	wt	+	+
39		<<50 ^b	DHA	100	A129S	–	–

Reaktionsbedingungen: 500 µL Gesamtvolumen, Konzentration des Donor- und Akzeptorsubstrats wie angegeben, 25 mM TEA-Puffer, pH 7.5, 25 °C, Enzym: 1.0 mg Ultrafiltrat oder 1.5 mg Lyophilisat; +: Neuer Fleck (DC) oder neues Signal (HPLC) beobachtet; (+): Verdacht auf neuen Fleck (DC), jedoch kein eindeutiges, diskretes Signal beobachtet; –: Keine Veränderung; ^aSubstrat aus Stammlösung teilweise präzipitiert/ausgeölt; ^bAnfärbung mit Anisaldehydreagenz. Kontrolle nach 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 und 48 h; ^cDerivatisierung mit *O*-Benzylhydroxylamin und Messung bei 215 nm nach 18, 24 und 48 h; ^dzusätzlich mit 6 eq Aldoldonor getestet; ^ezusätzlich mit 12 eq Aldoldonor getestet; ^fnicht bestimmt.

Bei den linearen sowie monozyklischen 3-Hydroxyaldehyden (Einträge 1 bis 12) konnten sowohl bei der Reaktion mit Hydroxyaceton und FSA^{wt} als auch mit Dihydroxyaceton und FSA^{A129S} die Ausbildung neuer Reaktionsprodukte beobachtet werden. Bei den Reaktionen mit FSA^{A129S} zeigte sich, dass der Reaktionsumsatz verhältnismäßig langsamer stattfindet als bei FSA^{wt}. Bei den linearen Dialdehyden (Einträge 13 bis 19) wurden Glyoxal (**113**), Bernsteinsäuredialdehyd (**143**) und Glutardialdehyd (**144**) getestet, wobei einzig bei der Reaktion mit Bernsteinsäuredialdehyd kein Umsatz zu beobachten war. Bernsteinsäuredialdehyd (**143**) ist nicht kommerziell erhältlich, kann aber ausgehend von 2,4-Dimethoxyfuran (**148**) erhalten werden.^[169] Für die Testansätze wurden zwei verschiedene Methoden zur Erzeugung von Bernsteinsäuredialdehyd (**143**) gewählt (Schema 56). Bei der ersten Methode wurde 2,4-Dimethoxyfuran (**148**) in wässriger Lösung durch DOWEX(H⁺)-Katalyse hydrolysiert und ohne weitere Aufreinigung als 500 mM Lösung eingesetzt. Bei der zweiten Methode wurde 2,4-Dimethoxyfuran (**148**) in wässriger Lösung zunächst unter Rückfluss erhitzt und der resultierende Dialdehyd dann durch Destillation in 26% Ausbeute isoliert.



Schema 56. Synthese von Bernsteinsäuredialdehyd (143).^[169]

Im zweiten Fall stellte sich heraus, dass im Vergleich zur Synthese nach PELŠS,^[169] der Dialdehyd einerseits nicht in ausreichender Reinheit anfiel und andererseits die Substanz beim Überführen in eine wässrige Lösung dazu neigt, spontan zu polymerisieren. Der Versuch, den Dialdehyd in Methanol aufzunehmen, scheiterte ebenfalls. Das Substrat ließ sich hingegen gut in THF lösen, bei Zugabe von Wasser trat jedoch direkt wieder Polymerisation ein. Der Überstand wurde für die Testreaktionen verwendet, trotz des Umstands, dass das Substrat nur noch in verringerten Mengen vorhanden war und dass Verunreinigungen durch den Polymerisierungsprozess bei der Enzymreaktion stören könnten.

Da Malondialdehyd wegen seiner Polymerisationstendenz nicht direkt eingesetzt werden kann, wurde dieser zunächst als einseitig geschützter Aldehyd **146** umgesetzt. Beim Reaktionsprodukt (Kapitel 3.2.5) wurde dann die Acetalgruppe entfernt und der freigesetzte Aldehyd **147** weiter geprüft (Eintrag 16). Zusätzlich wurde auch einseitig geschütztes Glyoxal **145** getestet, womit jedoch keine Reaktion stattfand. Bei den linearen Bis-(3-hydroxyaldehyden) (Einträge 20 bis 23) konnte nur für (±)-3,4-Dihydroxyhexandial ((±)-**70**) mit Hydroxyaceton ein Umsatz beobachtet werden. Bei den monozyklischen Bis-(3-hydroxyaldehyden) (Einträge 24 bis 29) wurde nur für die Dialdehyde **77** und **78** mit Hydroxyaceton eine mögliche Produktbildung mittels Dünnschichtchromatographie beobachtet, wobei jedoch keine eindeutig diskreten neuen Flecken zu sehen waren. Bei den polyzyklischen 3-Hydroxymono- und dialdehyden (Einträge 30 bis 39) konnte durchweg nur ein Umsatz beim Einsatz von FSA^{wt} und Hydroxyaceton beobachtet werden. Der Dialdehyd **118** (Eintrag 36) zeigte keinerlei Umsatz. Beim Adamantylsubstrat **128** (Eintrag 37) ist anzumerken, dass bei der Herstellung des Aldehyds (Kapitel 3.1.4) keine homogene Lösung hergestellt wurde, unabhängig davon aber auch kein Umsatz mit Hydroxyaceton beobachtet wurde. Ungeklärt ist, ob überhaupt noch genügend Aldehyd für die Enzymreaktion vorhanden war.

3.2.2 Aktivitätsscreening von FSA^{wt} und FSA^{A129S} bei höheren Temperaturen

Die FSA toleriert Reaktionen bei höheren Temperaturen. Die Halblebenszeit von FSA^{wt} bei einer Temperatur von 55 °C liegt bei 200 h,^[24] weshalb exemplarisch an den 3-Hydroxyaldehyden **73a-d** geprüft wurde, welchen Einfluss eine Temperaturerhöhung auf die enzymkatalysierte Reaktion hat. Die Reaktionen wurden jeweils mit Hydroxyaceton und Dihydroxyaceton bei 25 °C sowie 52.5 °C unter Katalyse von FSA^{wt} und FSA^{A129S} angesetzt. Analog zu den vorherigen Testreaktionen wurde der Aldoldonor im Verhältnis 3:1 zum Aldolakzeptor zugegeben. Zusätzlich wurden die Reaktionen als Blindreaktionen ohne FSA durchgeführt.

Der chronologische Verlauf der Reaktionen ist exemplarisch anhand der HPLC-Daten von 3-Hydroxy-3-methylbutanal (**73a**), 3-Ethyl-3-hydroxypentanal (**73b**) und 2-(1-Hydroxycyclopentyl)acetaldehyd (**73c**) gezeigt. Die HPLC-Daten für 2-(1-Hydroxycyclohexyl)acetaldehyd (**73d**) sind dem Spektrenanhang zu entnehmen, wobei die Ergebnisse aufgrund der Ähnlichkeit zu **73c** hier nicht im Detail diskutiert werden. Für eine einheitlich empfindliche Aldehyd- bzw. Ketonanalytik wurden die Analysenproben zunächst mit *O*-Benzylhydroxylamin in

Pyridin derivatisiert. In den Reaktionsschemata ist zugunsten der Übersichtlichkeit das jeweilige underivatisierte Substrat gezeigt.

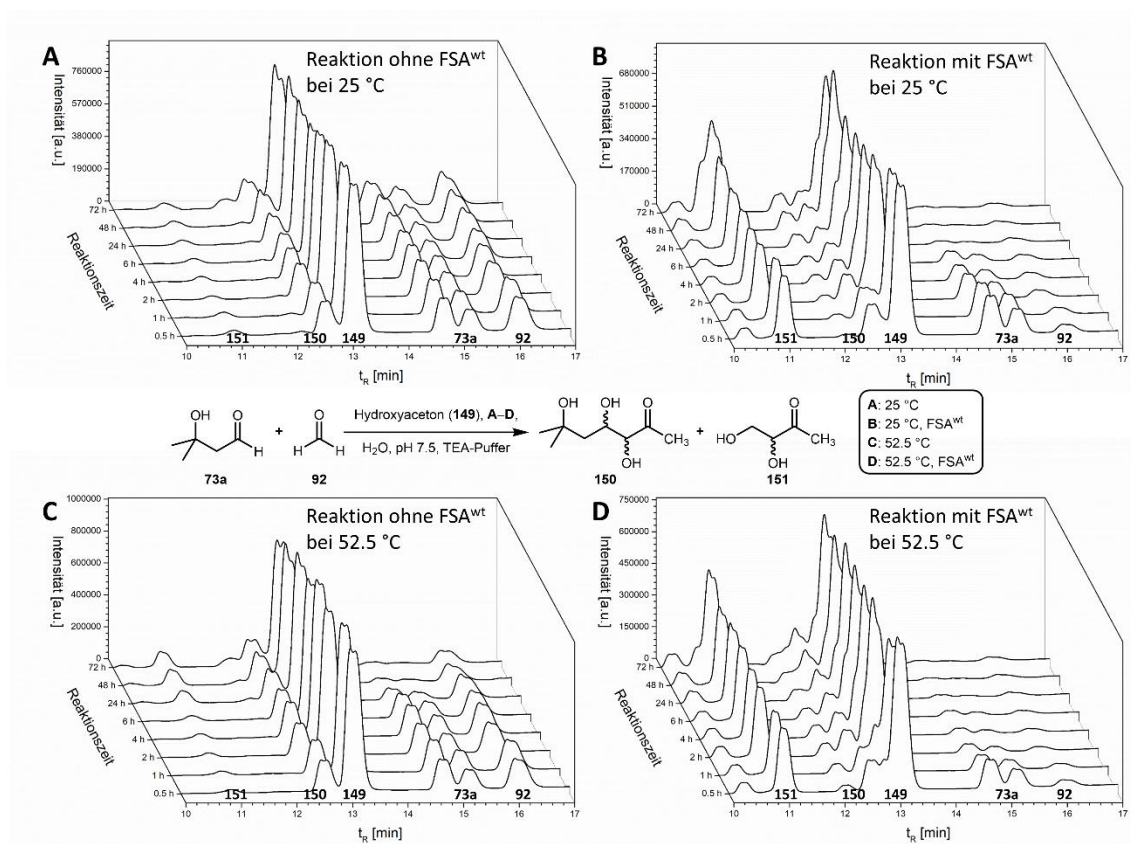


Abbildung 16. HPLC-Analyse des Temperaturscreenings von 3-Hydroxy-3-methylbutanal (**73a**) mit Hydroxyacetone (**149**). A) Reaktion ohne FSA^{wt} bei 25 °C, B) Reaktion mit FSA^{wt} bei 25 °C, C) Reaktion ohne FSA^{wt} bei 52.5 °C, D) Reaktion mit FSA^{wt} bei 52.5 °C.

Bei der Umsetzung von 3-Hydroxy-3-methylbutanal (**73a**) mit Hydroxyacetone (**149**) bei 25 °C, in Ab- (**A**) und Anwesenheit (**B**) von FSA^{wt}, konnte beobachtet werden, dass Formaldehyd (**92**) bereits unter den gegebenen Reaktionsbedingungen ohne Zusatz von FSA^{wt} langsam abreagiert (Abbildung 16). Da das Produktsignal von **150** sich mit dem Signal von Hydroxyacetone (**149**) überlagert, konnte keine quantitative Aussage zum Umsatz des Startsubstrats unter Abwesenheit des Enzyms gemacht werden. Eine exemplarische Untersuchung der Reaktion bei 52.5 °C nach 72 Stunden (Abbildung 17) zeigte, dass unter den gegebenen Reaktionsbedingungen, eine Bildung von Produkt **150** zu beobachten war.

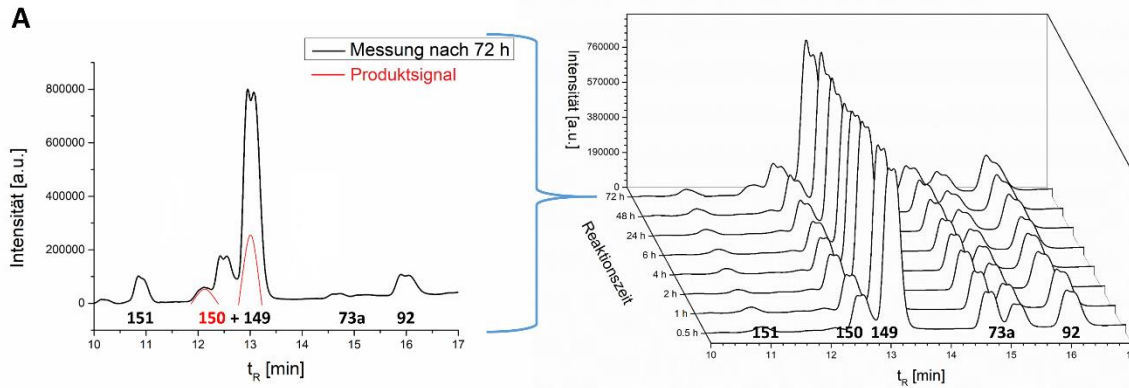


Abbildung 17. HPLC-Analyse des Temperaturscreenings von 3-Hydroxy-3-methylbutanal (**73a**) mit Hydroxyacetone (**149**) ohne FSA^{wt} bei 25 °C. Chromatogramm nach 72 h vergrößert dargestellt und überlagertes Produktsignal **150** in rot hervorgehoben.

Setzt man die Umsatzrate der enzymkatalysierten Reaktion (**B**) in Relation zur chemisch katalysierten Reaktion (**A**), so zeigt sich, dass Erstere bereits nach 24 h zu einer deutlich schnelleren Umsetzung des Substrats beiträgt. Die Reaktionen bei 52.5 °C (**C** und **D**) zeigten, dass die Umsatzrate im Vergleich zu den Reaktionen bei 25 °C zwar erhöht ist, jedoch der Anteil an chemischer Katalyse ebenfalls in höherem Maß auftritt.

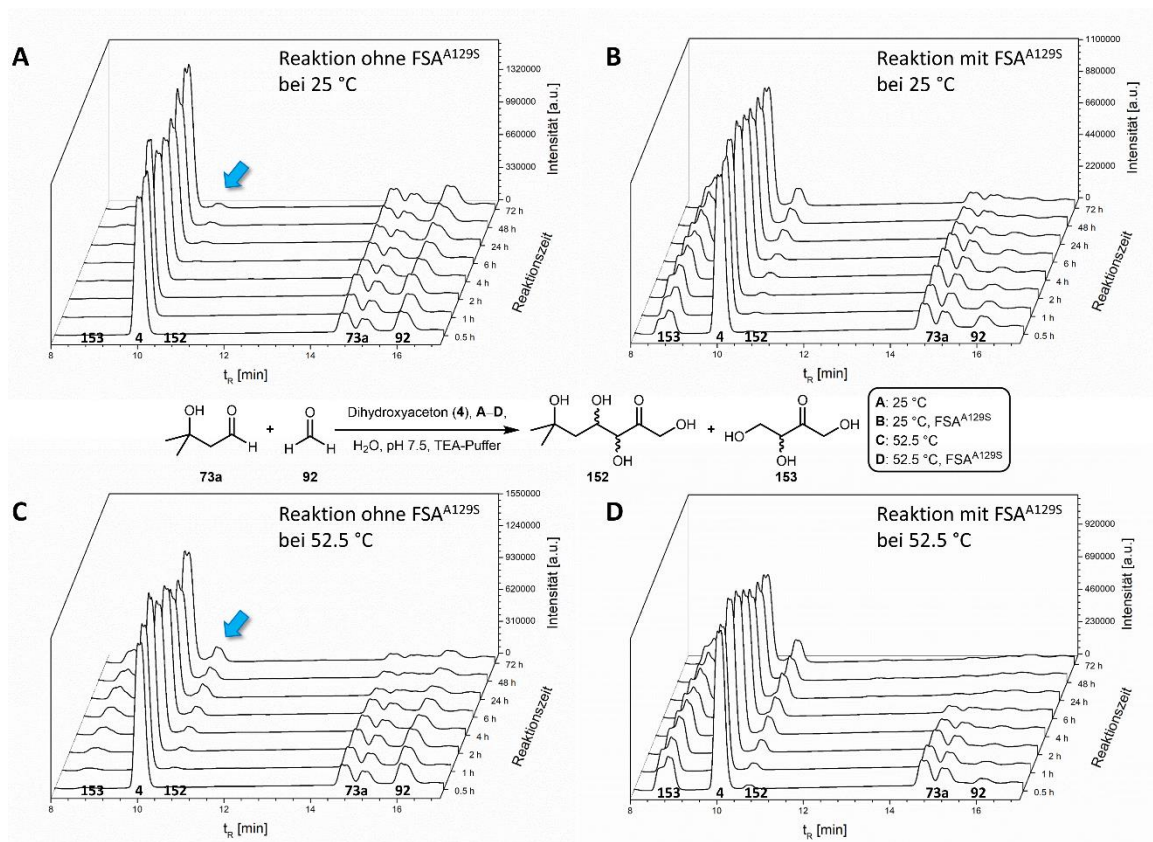


Abbildung 18. HPLC-Analyse des Temperaturscreenings von 3-Hydroxy-3-methylbutanal (**73a**) mit Dihydroxyacetone (**4**). A) Reaktion ohne FSA^{A129S} bei 25 °C, B) Reaktion mit FSA^{A129S} bei 25 °C, C) Reaktion ohne FSA^{A129S} bei 52.5 °C, D) Reaktion mit FSA^{A129S} bei 52.5 °C. Blauer Pfeil: Nicht-enzymkatalysierte Bildung von Produkt **152**.

Analog zu den Reaktionen von 3-Hydroxy-3-methylbutanal (**73a**) mit Hydroxyacetone (**149**) und FSA^{wt} wurde bei den Reaktionen mit Dihydroxyacetone (**4**) ohne Enzym ein Umsatz sowohl von Formaldehyd (**92**), als auch des

3-Hydroxyaldehyds **73a** beobachtet (Abbildung 18). Auffällig ist, dass der Aldehyd **73a** unter Katalyse von FSA^{A129S} mit Dihydroxyaceton (**4**) bei 25 °C (**B**) vergleichsweise langsamer umgesetzt wird als mit Hydroxyaceton (**149**) unter Katalyse von FSA^{wt}, wo bereits nach 72 Stunden das Substrat fast vollständig verbraucht war (Abbildung 16, **B**).

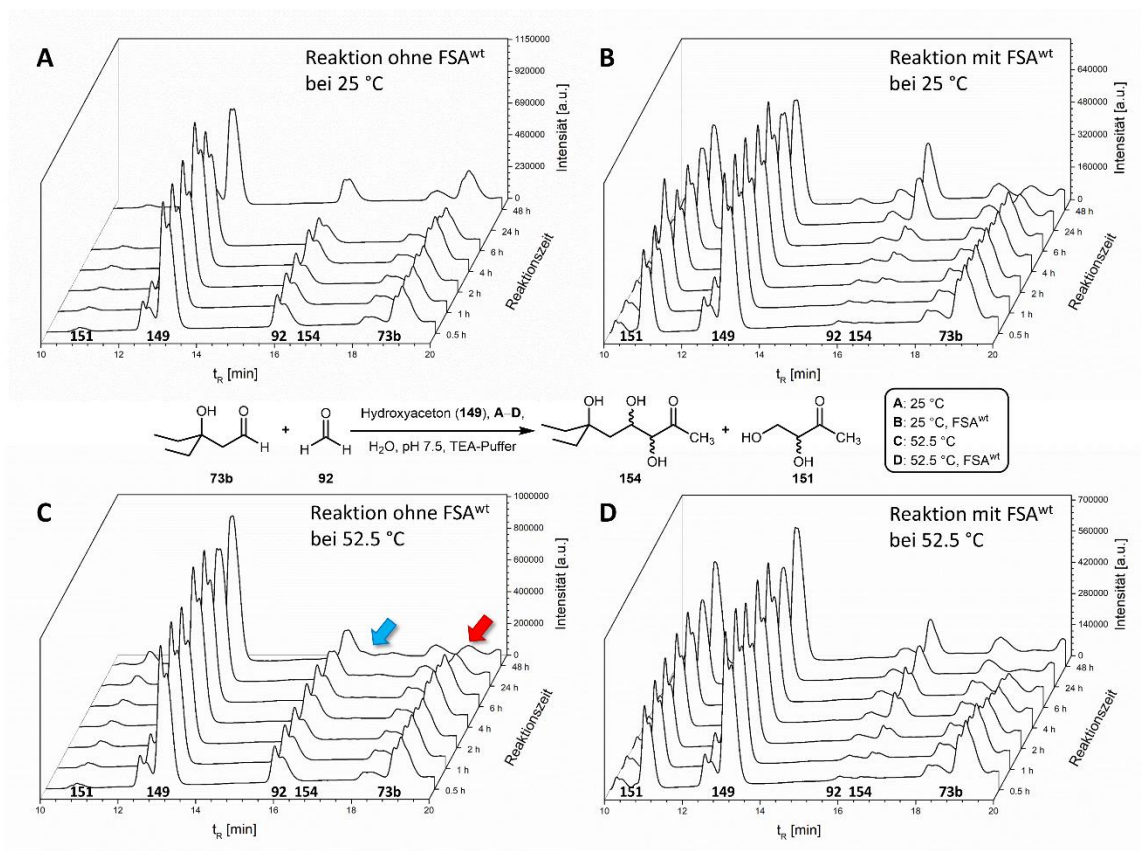


Abbildung 19. HPLC-Analyse des Temperaturscreenings von 3-Ethyl-3-hydroxypentanal (**73b**) mit Hydroxyaceton (**149**). A) Reaktion ohne FSA^{wt} bei 25 °C (Messung bei 24 h nicht gezeigt), B) Reaktion mit FSA^{wt} bei 25 °C, C) Reaktion ohne FSA^{wt} bei 52.5 °C, D) Reaktion mit FSA^{wt} bei 52.5 °C. Blauer Pfeil: Nicht-enzymkatalysierte Bildung von Produkt **154**. Roter Pfeil: Vermutete Zersetzung des Substrats **73b**.

Bei den FSA^{wt}-katalysierten Reaktionen (**B** und **D**) von 3-Ethyl-3-hydroxypentanal (**73b**) war zu beobachten, dass Formaldehyd (**92**) bereits nach 30 Minuten vollständig umgesetzt wurde (Abbildung 19), während der Beginn einer Produktbildung von **154** erst nach etwa einer Stunde zu sehen war. Bei der Reaktion ohne FSA^{wt} bei 52.5 °C (**C**) war eine Abnahme des Startsubstrats **73b** zu beobachten, während nur eine geringe Produktbildung zu beobachten war. Dies scheint darauf hinzuweisen, dass bei erhöhten Temperaturen eventuell eine Zersetzung oder eine anderweitige Reaktion des 3-Hydroxyaldehyds **73b** eintritt. Bei der Reaktion mit FSA^{wt} bei 52.5 °C (**D**) war zu erkennen, dass das Produkt **154** etwas schneller als bei 25 °C (**B**) abreagiert, wobei in Relation zur Reaktion bei 25 °C weniger Produkt gebildet wurde. Zieht man die Beobachtung aus der unkatalysierten Reaktion bei 52.5 °C (**C**) in Betracht, dass der 3-Hydroxyaldehyd **73b** bei erhöhten Temperaturen anderweitig abreagiert, dann lässt sich die Hypothese formulieren, dass es sich hierbei um eine Zersetzung des Startsubstrats handelt.

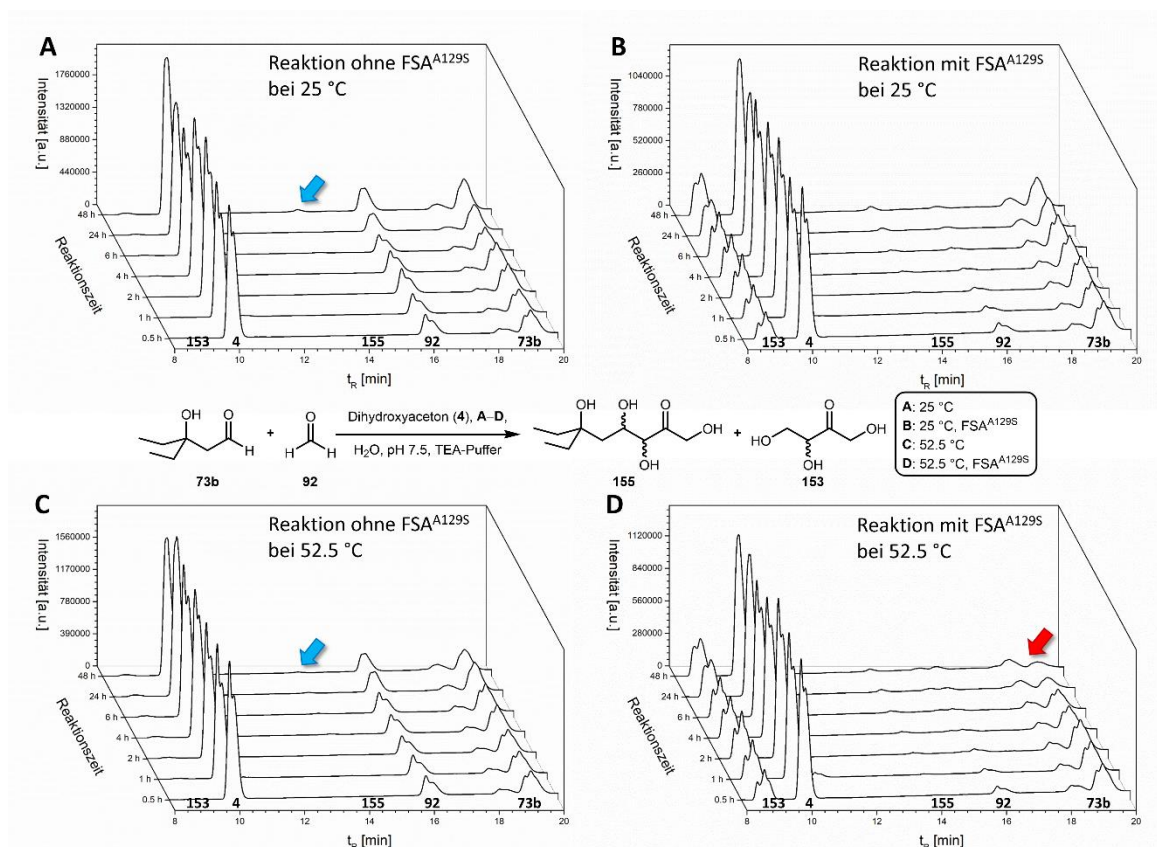


Abbildung 20. HPLC-Analyse des Temperaturscreenings von 3-Ethyl-3-hydroxypentanal (**73b**) mit Dihydroxyaceton (**4**). A) Reaktion ohne FSA^{A129S} bei 25 °C, B) Reaktion mit FSA^{A129S} bei 25 °C, C) Reaktion ohne FSA^{A129S} bei 52.5 °C, D) Reaktion mit FSA^{A129S} bei 52.5 °C. Blauer Pfeil: Nicht-enzymkatalysierte Bildung von Produkt **155**. Roter Pfeil: Vermutete Zersetzung des Substrats **73b**.

Die Reaktionen mit FSA^{A129S} und Dihydroxyaceton (**4**) verliefen vergleichsweise langsamer, was daran zu erkennen war, dass Formaldehyd (**92**) erst nach 2 bis 4 Stunden vollständig abreagiert war. Daraus lässt sich folgern, dass die Reaktion zwischen dem Aldehyd **73b** und Dihydroxyaceton (**4**) ebenfalls langsamer ablaufen sollte (Abbildung 20). Ersichtlich wird dies bei 25 °C an der Bildung des Produkts **155** (Signal bei $t_R \approx 14$ min) bei der Reaktion mit FSA^{A129S} (**B**), welches frühestens nach etwa 4 Stunden beobachtet werden konnte und daran, dass nach 48 Stunden jeweils noch Startmaterial vorhanden war. Die Reaktion mit FSA^{A129S} bei 52.5 °C (**D**) verlief hingegen ähnlich schnell, wobei der Aldehyd **73b** nach 48 Stunden ungefähr zur Hälfte abreagiert war. Bei der Reaktion ohne FSA^{A129S} bei 52.5 °C (**C**) war im Vergleich zur Reaktion mit Hydroxyaceton die Zersetzung des Substrats nur schwach zu erkennen. Dieser Unterschied zur Reaktion mit Hydroxyaceton (**149**) bei 52.5 °C lässt sich zwar nicht schlüssig klären, es besteht jedoch die Vermutung, dass 3-Hydroxyaldehyde bei höheren Temperaturen über einen längeren Zeitraum jedoch weniger stabil sind. Eine Eliminierung des Substrats kann jedoch bei den verwendeten Reaktionsbedingungen ausgeschlossen werden. Da die Reaktionen jeweils bei pH 7.5 durchgeführt wurden und die Eliminierungsreaktion bevorzugt im Sauren stattfindet, müssten für Eliminierungen im Basischen deutlich höhere Reaktionstemperaturen als 52.5 °C nötig sein.

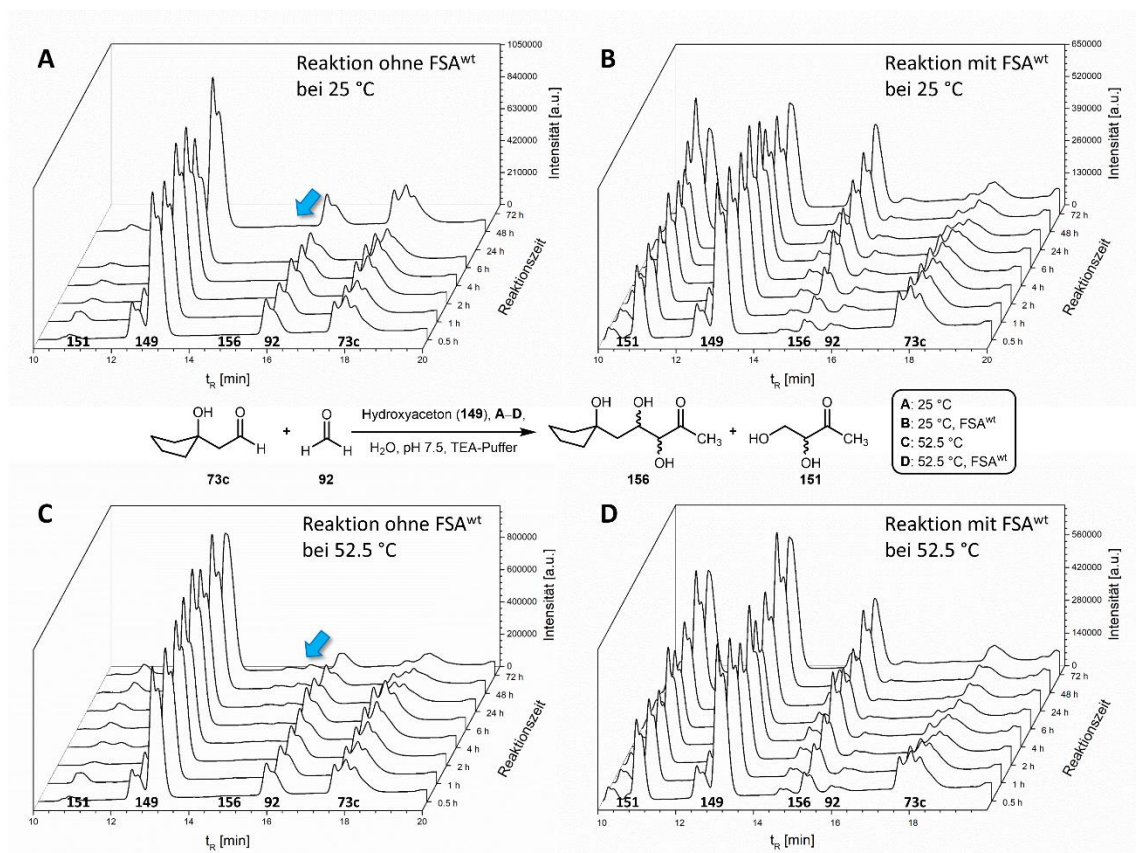


Abbildung 21. HPLC-Analyse des Temperaturscreenings von 2-(1-Hydroxycyclopentyl)acetaldehyd (**73c**) mit Hydroxyacetone (**149**). A) Reaktion ohne FSA^{wt} bei 25 °C (Messung bei 24 h und 72 h nicht gezeigt), B) Reaktion mit FSA^{wt} bei 25 °C, C) Reaktion ohne FSA^{wt} bei 52.5 °C, D) Reaktion mit FSA^{wt} bei 52.5 °C. Blauer Pfeil: Nicht-enzymkatalysierte Bildung von Produkt **156**.

Bei der Umsetzung von 2-(1-Hydroxycyclopentyl)acetaldehyd (**73c**) zeigte sich wie schon bei den Substraten **73a** und **73b**, dass Formaldehyd (**92**) bei 25 °C sowie 52.5 °C ohne Zusatz des Katalysators bereits mit Hydroxyacetone (**149**) sowie Dihydroxyacetone (**4**) langsam zu 1-Desoxy-L-erythrulose (**151**) bzw. L-Erythrulose (**153**) abreagiert (Abbildung 21 und Abbildung 22). Der 3-Hydroxyaldehyd **73c** reagiert ebenso unter chemischer Katalyse (je **A** und **C**), wenn auch langsamer, ab. Wiederholungen der Messungen ohne Enzym führten zur gleichen Beobachtung, es wurden jedoch teils deutlichere Unterschiede in der Geschwindigkeit der Umsatzrate beobachtet. Daraus folgt, dass die Ergebnisse aufgrund der teils deutlichen Schwankungen nicht quantitativ auswertbar sind, dafür aber eine qualitative Aussage ermöglichen. Durch die Temperaturerhöhung ist ein Anstieg der Umsatzrate von **73c** erkennen. Bei der Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 52.5 °C zeigte sich, dass der Anteil an chemisch gebildetem Produkt, d. h. ohne Einfluss des Enzyms, ansteigt, sodass bei Reaktionen mit höheren Temperaturen eine Konkurrenz zwischen enzymatischer und chemischer Katalyse auftritt.

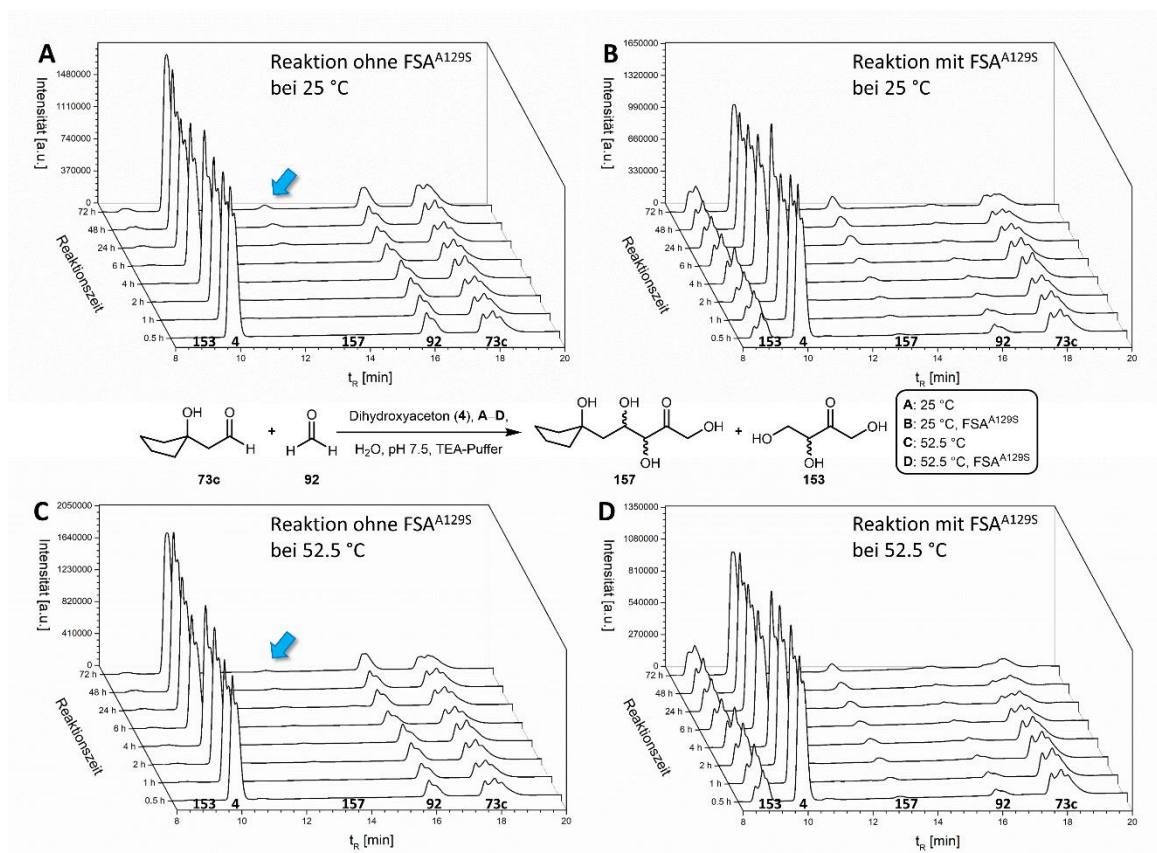


Abbildung 22. HPLC-Analyse des Temperaturscreenings von 2-(1-Hydroxycyclopentyl)acetaldehyd (**73c**) mit Dihydroxyacetone (**4**). A) Reaktion ohne FSA^{A1295} bei 25 °C, B) Reaktion mit FSA^{A1295} bei 25 °C, C) Reaktion ohne FSA^{A1295} bei 52.5 °C, D) Reaktion mit FSA^{A1295} bei 52.5 °C. Blauer Pfeil: Nicht-enzymkatalysierte Bildung von Produkt **157**.

Allgemein wurde bei den hier untersuchten Reaktionen über die HPLC-Daten beobachtet, dass bei Abwesenheit von der FSA sogar bei Temperaturen um 25 °C eine Umsetzung der Aldehyde zu beobachten war. Die Geschwindigkeit des Umsatzes ist geringer als bei 52.5 °C, jedoch teilweise schon nach 2 bis 4 Stunden detektierbar. Die Trends der relativen Bildungsrate der Produkte aus den Reaktionen der 3-Hydroxyaldehyde **73a–d** mit Dihydroxyacetone (**4**) sind in Abbildung 23 dargestellt. Aus diesen lässt sich ableiten, dass die enzymkatalysierte Reaktion schneller verläuft als die nicht-enzymkatalysierte Reaktion. Prinzipiell ist mit Erhöhung der Temperatur ein Anstieg der Produktbildungsrate zu erkennen, wobei der Anteil der chemisch katalysierten Reaktion bei 25 °C, im Gegensatz zu 52.5 °C, deutlich geringer gegenüber dem enzymatisch katalysierten Part ausfällt. Die Schwankungen der Signale aus den Blindmessungen von 2-(1-Hydroxycyclopentyl)acetaldehyd (**73c**) nach 4 und 6 Stunden (**B**) lassen sich auf systematische Fehler bei der Probenpräparation zurückführen, da der Verlauf nach 24 und 48 Stunden den allgemeinen Beobachtungen entspricht. Die Trendlinie für die Messung bei 25 °C ohne FSA^{A1295} wurde ausgelassen, da die Datensätze zu ungenau waren, insgesamt lässt sich jedoch ableiten, dass die Reaktion relativ langsam ablief. Bei Substrat **157** (**C**) ist die Bildungsrate, im Vergleich zu den anderen Strukturen, bei 25 und 52.5 °C vertauscht, was jedoch auf die Ungenauigkeit der Signalbestimmung aus den HPLC-Daten zurückzuführen ist.

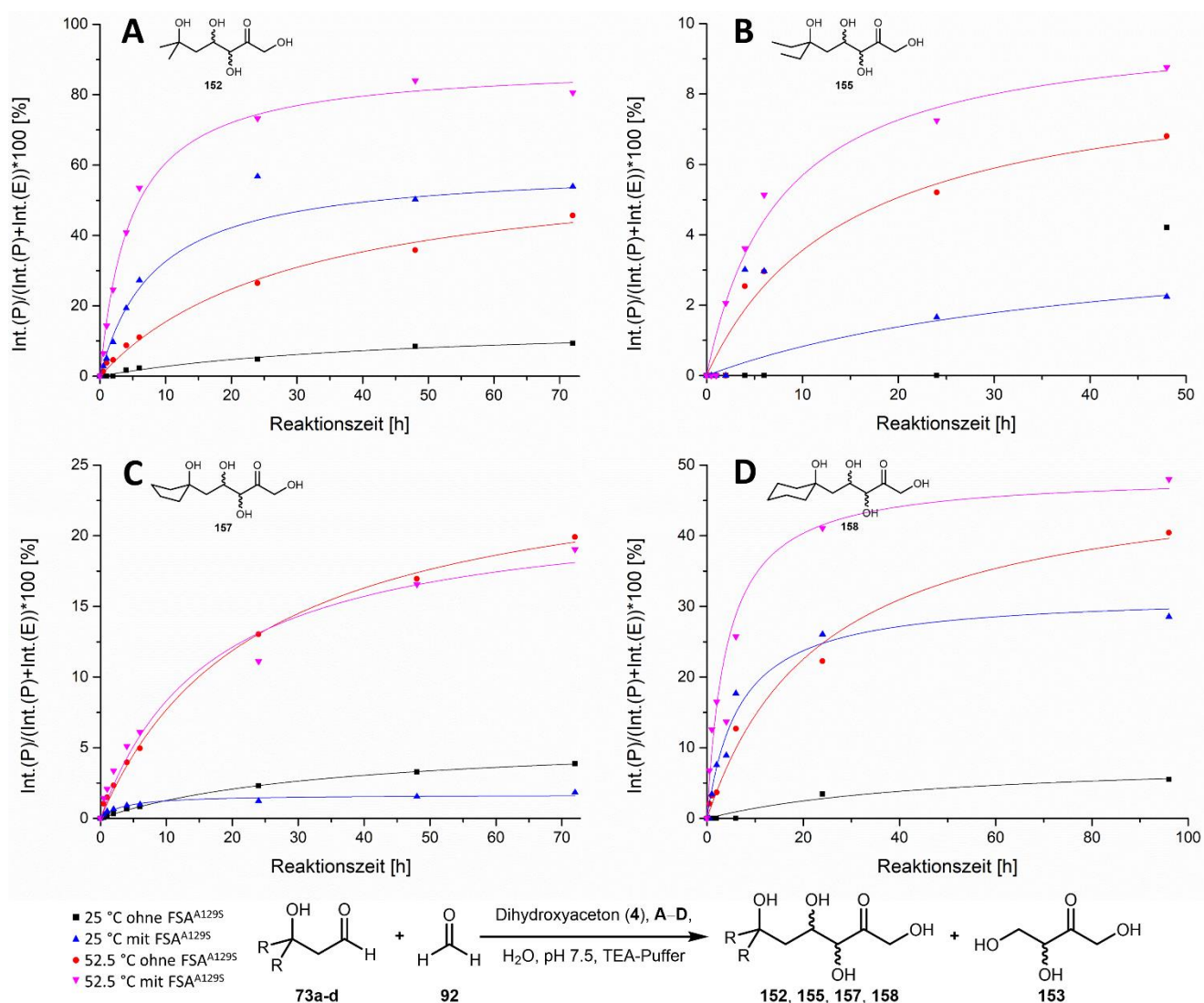


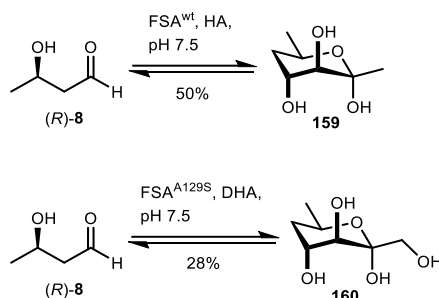
Abbildung 23. Relative Bildungsraten der Produkte **152 (A)**, **155 (B)**, **157 (C)** und **158 (D)** aus den Reaktionen der 3-Hydroxyaldehyde **73a–d** mit Dihydroxyaceton (**4**). Die durchgezogenen Linien stellen Trendlinien dar. Die Trendlinie in **B** für die Reaktion bei 25 °C ohne FSA^{A129S} wurde aufgrund der ungenauen Datensätze ausgelassen.

Bei den Blindproben ohne Enzym konnte bei den Reaktionskontrollen mittels Dünnschichtchromatographie nach 24 und 48 Stunden in keinem der Fälle eine Produktbildung beobachtet werden, obwohl laut der HPLC-Daten eine Produktbildung hätte nachweisbar sein können. Wenn die Reaktionen unter den gegebenen Bedingungen bei 25 °C chemisch-katalysiert stattfinden, dann ist im Vergleich zur FSA-katalysierten Reaktion keine Diastereopräferenz gegeben. Wie sich zeigte, ist die enzymatische Umsetzung gegenüber der nicht-enzymatischen jedoch deutlich schneller. Die später (Kapitel 3.2.3.1) isolierten Produkte wiesen eine (3S,4R)-Konfiguration auf, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass die FSA zu einem geringen Anteil auch eine andere Diastereokonfiguration aufbaut, da derartige Produkte auch anteilig durch nicht-enzymatische Katalyse gebildet werden können. Da die meisten Synthesen im folgenden Abschnitt jeweils innerhalb von 3 Tagen durchgeführt wurden, sollte der Anteil an nicht-enzymatisch gebildeten Reaktionsprodukten verhältnismäßig gering sein.

3.2.3 Synthesen ausgehend von linearen 3-Hydroxyaldehyden

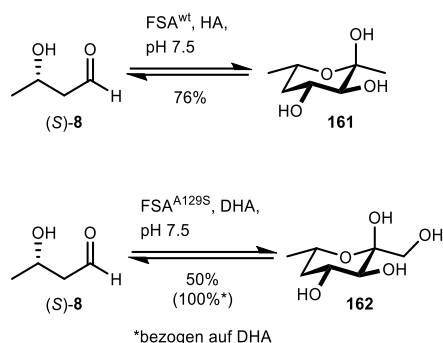
Basierend auf den Ergebnissen des Substratscreenings (Tabelle 21) wurden positiv bewertete FSA-katalysierte Reaktionen nachfolgend im präparativen Maßstab durchgeführt. Anders als bei den Testreaktionen wurde auf den Einsatz von Triethanolaminpuffer verzichtet, da sich dieser bei der säulenchromatographischen Aufreinigung als schwierig zu entfernen erwies. Um zu gewährleisten, dass die Reaktionen bei konstantem pH-Wert stattfanden, wurde dieser bei Bedarf manuell nachjustiert.

Frühere Studien haben gezeigt, dass hydroxylierte aliphatische Aldehyde in FSA-katalysierten Reaktionen gegenüber unsubstituierten Substraten allgemein bevorzugt werden.^[120] Die insgesamt erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit solcher Aldolreaktionen ist auf die verbesserte Elektrophilie dieser Substrate zurückzuführen.^[113] Jüngste Arbeiten von ROLDÁN *et al.*^[129] haben gezeigt, dass beide (*R*)- und (*S*)-Enantiomere von **8** gute Substrate für FSA-katalysierte Reaktionen sind. In der Publikation wurde die Verwendung von Acetaldehyd und Aceton als weniger hydrophile Donorkomponenten hervorgehoben, wohingegen in der vorliegenden Studie Hydroxyaceton und Dihydroxyaceton als Donoren verwendet wurden. Analog zu ähnlichen Reaktionen von racemischem **8** mit DHAP und FruA von DURRWACHTER *et al.*^[170] wurde die Reaktivität beider Enantiomere sowohl mit dem FSA-Wildtyp als auch der Variante A129S getestet (Schema 57). Reaktionen von (*R*)-**8** mit HA und DHA lieferten das energetisch bevorzugte Produkt in ⁴C₁-Konformation, bei dem erwartungsgemäß die Hydroxygruppen in 3- und 4-Position nach Ausweis der vicinalen Kopplungskonstanten (**159**: ³J_{3,4} = 3.2 Hz und **160**: ³J_{3,4} = 3.3 Hz) zwischen 3/4-H in axialer Position orientiert sind (Schema 57). Zusätzlich war eine Fernkopplung zwischen 3/5_{eq}-H wegen einer W-Anordnung und des starren Ringsystems mit ⁴J = 0.9 Hz zu beobachten. Produkte **159** und **160** wurden in einer Ausbeute von 50% bzw. 28% erhalten.



Schema 57. FSA^{wt}- bzw. FSA^{A129S}-katalysierte Umsetzung von (*R*)-3-Hydroxybutanal ((*R*)-**8**) mit HA bzw. DHA. Produkte sind in β-Anomerform dargestellt.

Reaktionen von (*S*)-**8** mit HA bzw. DHA führten zu den entsprechenden Produkten, bei denen die beiden Hydroxygruppen äquatorial in 3- und 4-Position orientiert sind, in Ausbeuten von 76% für **161** und 50% für **162** (Schema 58). Das Vorliegen der Verbindungen in ¹C₄-Konformation lässt sich durch die charakteristischen vicinalen Kopplungskonstanten der Protonen in 3/4/5_{ax}-Position bestätigen, wobei diese jeweils *trans*-diaxial zueinanderstehen (Kopplungskonstanten von **161**: ³J_{3,4} = 9.4 Hz, ³J_{4,5ax} = 11.6 Hz und **162**: ³J_{3,4} = 9.5 Hz, ³J_{4,5ax} = 11.6 Hz). Da die Protonen in Position 3 und 5_{ax} beide axial stehen, wäre es theoretisch möglich aufgrund der W-Anordnung und des fixierten Ringsystems eine Fernkopplung zu beobachten. Diese Kopplungskonstante beträgt üblicherweise etwa ⁴J ≈ 1-2 Hz, konnte jedoch in beiden Fällen nicht beobachtet werden.



Schema 58. FSA^{wt}- bzw. FSA^{A129S}-katalysierte Umsetzung von (S)-3-Hydroxybutanal ((S)-8) mit HA bzw. DHA. Produkte sind in β -Anomerform dargestellt.

Bei den FSA^{A129S}-katalysierten Reaktionen ergaben sich mit 3-Hydroxyaldehyden und DHA insgesamt niedrigere Gesamtausbeuten als mit HA. Zudem scheinen beide FSA-Varianten eine gewisse kinetische Präferenz für das Enantiomere (S)-8 zu besitzen. ROLDÁN *et al.* hatten ebenfalls einen ähnlichen Trend bei anderen FSA-Varianten beobachtet,^[129] bei denen mit (R)-8 auch geringere Ausbeuten im Vergleich zu (S)-8 erhalten wurden, was die Hypothese stärkt, dass die FSA bevorzugt (S)-konfigurierte 3-Hydroxyaldehyde umsetzt. Um diesen Sachverhalt nachzugehen wurde in Kapitel 3.2.3.4 eine kompetitive Reaktion mit einem Überschuss an racemischen *rac*-8 und Hydroxyaceton durchgeführt.

3.2.3.1 Konformerbestimmung am Beispiel von Desoxyzucker 160

Bei den aus (R)-3-Hydroxybutanal ((R)-8) erhaltenen Desoxyzuckern stellte sich die Frage, welches Konformer bevorzugt vorliegt, wobei die Hydroxygruppe des Aldehyds die absolute Konfiguration der gebildeten D-5,7-Dideoxyketoheptose bereits vorgibt. Einerseits könnte die Methylgruppe äquatorial stehen (⁴C₁-Konformation), während dann beide Hydroxygruppen axial wären. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass die Methylgruppe im Zielmolekül axial steht (¹C₄-Konformation), während die Hydroxygruppen in Position 3 und 4 äquatorial stehen. Das anomere Zentrum kann äquilibrieren, wobei die Hydroxygruppe aufgrund des Anomeren Effekts bevorzugt axial vorliegen sollte. Aus thermodynamischen Aspekten müsste der Zucker das ⁴C₁-Konformer bevorzugen, da die Methylgruppe nach den Angyal-Parametern einen größeren räumlichen Anspruch als die beiden Hydroxygruppen aufweist. Um diese Hypothese zu stützen, wurden NMR-spektroskopisch die Protonensignale der Positionen 3 und 4 herangezogen. Die Kopplung der H-3 und -4 wurde mit den theoretischen Kopplungskonstanten von D-*arabino*-4,6-Dideoxy-hexose verglichen (Abbildung 24).

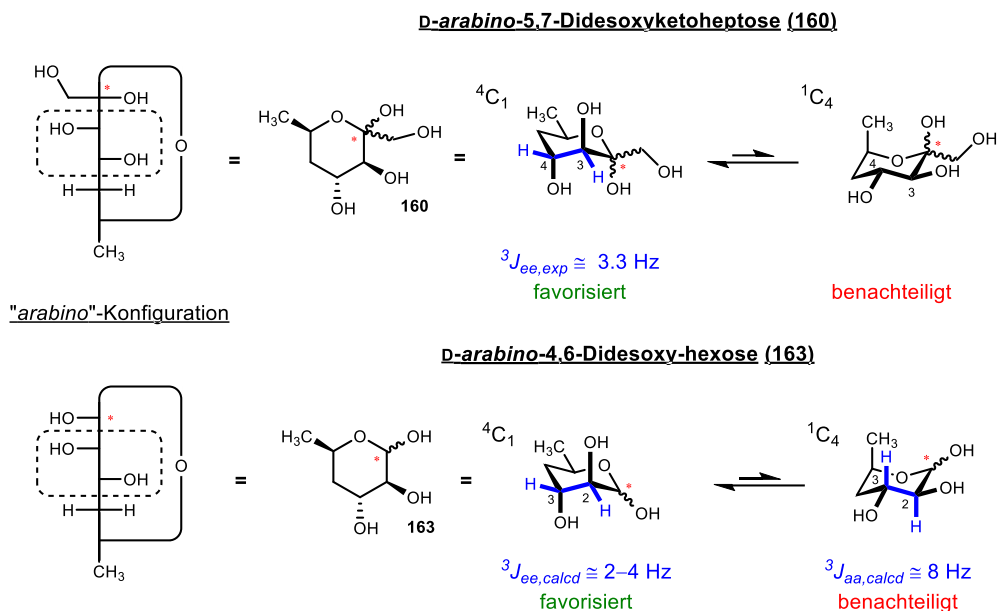


Abbildung 24. Konformerengleichgewicht des D-Desoxyzuckers **160**. Verglichen werden die beobachteten vicinalen Kopplungskonstanten (J_{exp}) zwischen den Protonen in Position 3 und 4 des D-Desoxyzuckers **160** mit den theoretischen vicinalen Kopplungskonstanten (J_{calcd}) der Protonen in Position 2 und 3 von D-arabino-4,6-Dideoxyhexose (**163**).

Für die vicinale Kopplung des Desoxyzuckers **160** zwischen den Protonen an Position 3 und 4 wurde eine Kopplungskonstante von $^3J_{3,4} = 3.3 \text{ Hz}$ ermittelt. Ein Wert zwischen 2 und 4 Hertz weist üblicherweise auf zwei axial-ständige Hydroxygruppen hin. Der Desoxyzucker **160** könnte in der „arabino“-Konfiguration entweder mit beiden Hydroxygruppen in axialer Position und dem Methylrest in äquatorialer Position vorliegen oder mit beiden Hydroxygruppen in äquatorialer Position und dem Methylrest in axialer Stellung. Die beobachtete Kopplungskonstante spricht für die bis-axiale Stellung der Hydroxygruppen, was mit der Überlegung übereinstimmt, dass der Methylrest wegen seines sterischen Anspruchs bevorzugt äquatorial steht. Zudem stimmen die beobachteten Werte der NMR-Signale (Signalform, Verschiebung und Kopplungskonstanten) mit denen des von WONG veröffentlichten Desoxyzucker überein, wobei der Aldehyd in dieser Publikation alternativ über eine Enzymkaskade aus Acetaldehyd hergestellt wurde.^[61]

3.2.3.2 Relative Konfigurationsbestimmung der Positionen 3 und 4 am Beispiel von Desoxyzucker **160**

Bei der natürlichen Reaktion zwischen D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyaceton wird die C–C-Bindung *syn*-selektiv mit (3*S*,4*R*)-Konfiguration geknüpft. Der Aldoldonor kann dabei in der FSA nur von einer Seite aus Angreifen, womit das Stereozentrum neben dem Carbonyl de facto fixiert ist, während der nukleophile Angriff an den Aldolakzeptor je nach Struktur flexibel sein kann. Da die in dieser Arbeit verwendeten Aldehyde vom natürlichen Akzeptor strukturell abweichen, stellte sich die Frage, ob die Aldoladdition dennoch diastereoselektiv und kongruent zur natürlichen Reaktion erfolgt. Anhand des Signalmusters der Protonen in 5-Position des Desoxyzuckers **160** ließ sich durch direkten Vergleich mit dem Signal der D-5,7-Dideoxyketoheptosen die Diastereoselektivität der C–C-Knüpfung durch FSA überprüfen (Abbildung 25).

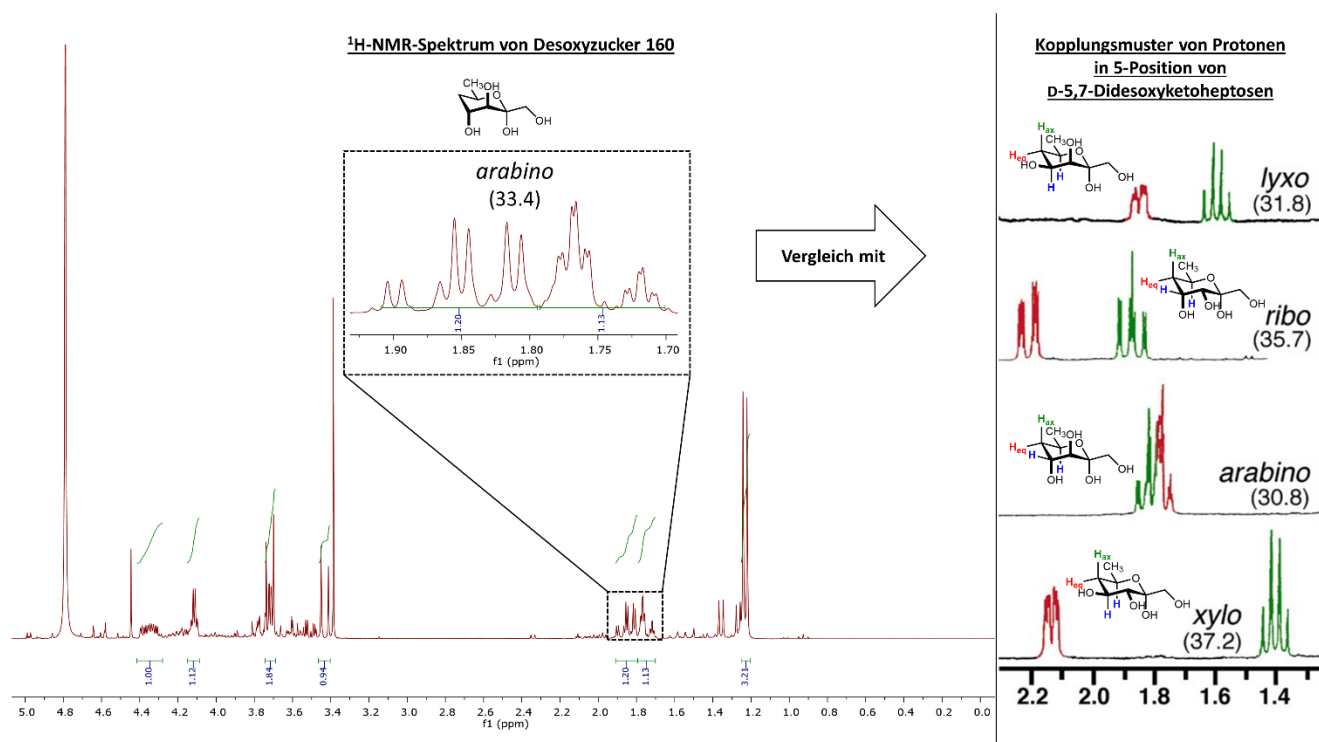


Abbildung 25. ¹H-NMR-Spektrum von Desoxyzuckern **160** (links) im Vergleich mit den Kopplungsmustern von Protonen in 5-Position von D-5,7-Dideoxyketoheptosen (rechts). Tieffeldverschiebung des H_{ax}-Signals (grün) jeweils bei *trans*-diaxialer Position zu vicinalem OH und Tieffeldverschiebung des H_{eq}-Signals (rot) jeweils bei W-Anordnung zu β-OH_{eq}. In Klammern: Chemische Verschiebung des Kohlenstoffsignals in 5-Position im ¹³C-NMR-Spektrum (in ppm).

Die Protonensignale des Desoxyzuckers **160** und die Beobachtungen aus der Konformationsanalyse weisen direkt auf die „arabino“-Konfiguration des Substrats und darauf aufbauend auf eine diastereoselektive Addition in (3*S*,4*R*)-Konfiguration hin. Daraus folgt, dass offenbar bei FSA-katalysierten Synthesen mit nicht-natürlichen Aldehyden die Diastereoselektivität erhalten bleibt.

3.2.3.3 Bestimmung des Hauptanomers der gebildeten Desoxyzucker

Die gebildeten Desoxyzucker aus der Addition von DHA an die 3-Hydroxyaldehyde liegen primär zyklisch vor, während die Produkte der 3-Hydroxyaldehyde mit HA üblicherweise in einem Gleichgewicht zwischen der offenkettigen und der zyklischen Form vorliegen. Da die zyklischen Desoxyzucker jeweils sowohl als α- als auch als β-Anomer vorliegen können und bei den NMR-Spektren meist ein deutlich bevorzugtes Anomer beobachtet wurde, stellte sich die Frage, welches der beiden Anomere energetisch bevorzugt ist. Hierzu wurde der Desoxyzucker **159** aus der Reaktion von (*R*)-3-Hydroxybutanal ((*R*)-**8**) mit HA NMR-spektroskopisch näher analysiert. Mittels eines [¹H/¹H]-NOESY-Experiments sollte untersucht werden, ob die Methylgruppe am anomeren Zentrum bevorzugt äquatorial oder axial steht (Abbildung 26).

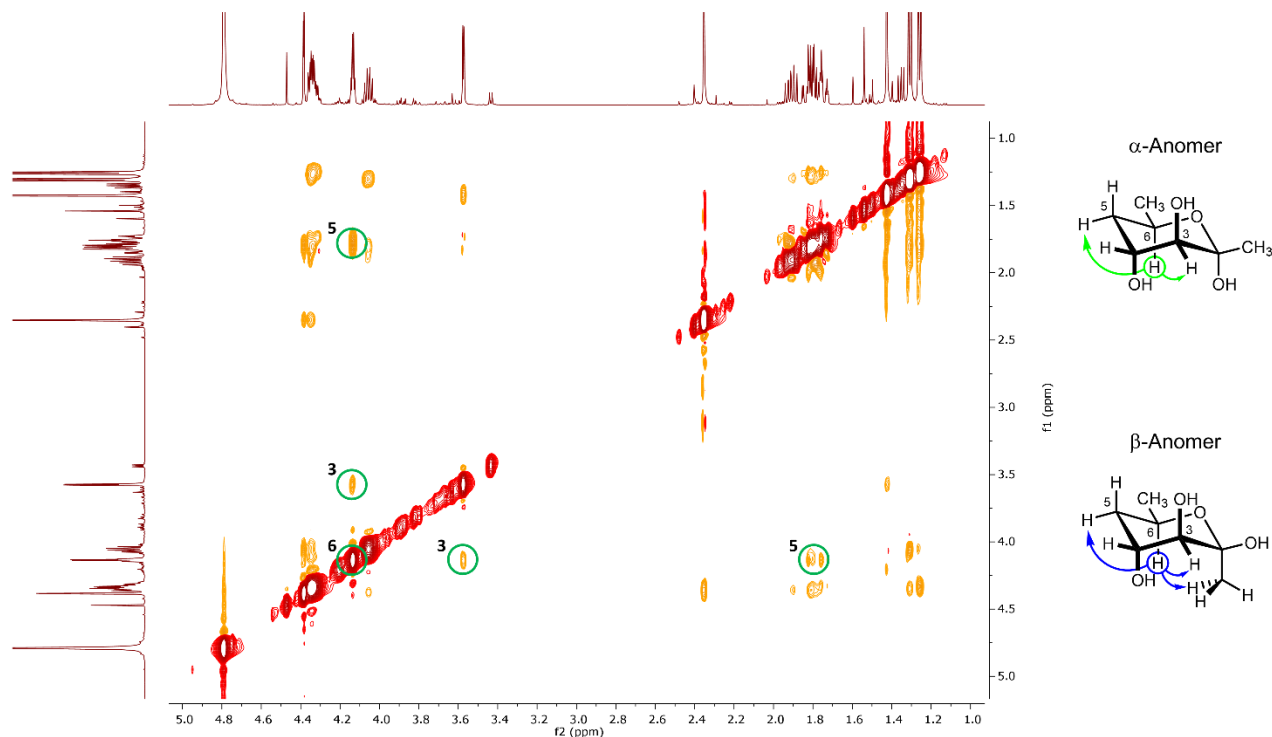
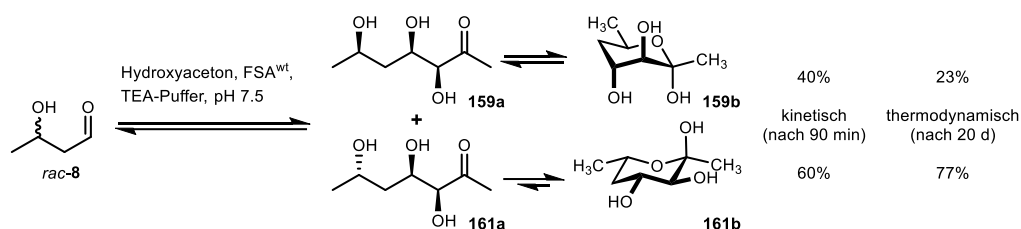


Abbildung 26. $[^1\text{H}/^1\text{H}]$ -NOESY des Desoxyzuckers **159** zur Bestimmung des Hauptanomers.

Im Fall einer äquatorial stehenden Methylgruppe sollte für das Proton in Position 6 nur eine direkte Kopplung zu den Protonen in Position 5 und eine Kopplung durch den Raum zum Proton in Position 3 zu beobachten sein. Die erwartete Kopplung ist in Abbildung 26 grün dargestellt. Für den Fall, dass die Methylgruppe axial steht, müsste zusätzlich eine Kopplung zu einem der Protonen der Methylgruppe in Position 1 zu beobachten sein, was in Abbildung 26 blau dargestellt ist. Im $[^1\text{H}/^1\text{H}]$ -NOESY des Desoxyzuckers **159** sind nur Kopplungen des Protons von Position 6 zu den Protonen in Position 5 und 3 zu sehen, was dafür spricht, dass dieser als α -Anomer vorliegt. Folglich ist davon auszugehen, dass die bei der Reaktion von 3-Hydroxyaldehyden mit HA und DHA gebildeten Desoxyzucker hauptsächlich die Methyl- bzw. Hydroxymethylengruppe in äquatorialer Position stehen haben, was sowohl die Erwartungen hinsichtlich sterischer Faktoren als auch des die α -Form begünstigenden anomeren Effekt erfüllt.

3.2.3.4 Untersuchung der Enantiomeraselektivität von FSA^{wt} für *rac*-3-Hydroxybutanal (*rac*-**8**)

Bei der Umsetzung von (*R*)- sowie (*S*)-3-Hydroxybutanal (**8**) wurde beobachtet, dass beim Einsatz von (*S*)-**8** im Vergleich zu (*R*)-**8** teils höhere Ausbeuten erzielt wurden (Kapitel 3.2.3). Um herauszufinden, ob die FSA^{wt} eines der beiden Enantiomere kinetisch bevorzugt umsetzt, wurden zwei Testreaktionen durchgeführt, bei denen racemisches 3-Hydroxybutanal (*rac*-**8**) unter FSA^{wt}-Katalyse einmal mit drei Äquivalenten sowie einmal mit einem halben Äquivalent an HA umgesetzt wurde (Schema 59.).



Schema 59. FSA^{wt}-katalysierte Umsetzung von *rac*-8 mit Hydroxyacetone.

Die Reaktionen wurden über einen Zeitraum von 3 Stunden alle 15 Minuten NMR-spektroskopisch vermessen. Der Reaktionsverlauf von *rac*-3-Hydroxybutanal mit drei Äquivalenten HA ist in Abbildung 27 gezeigt.

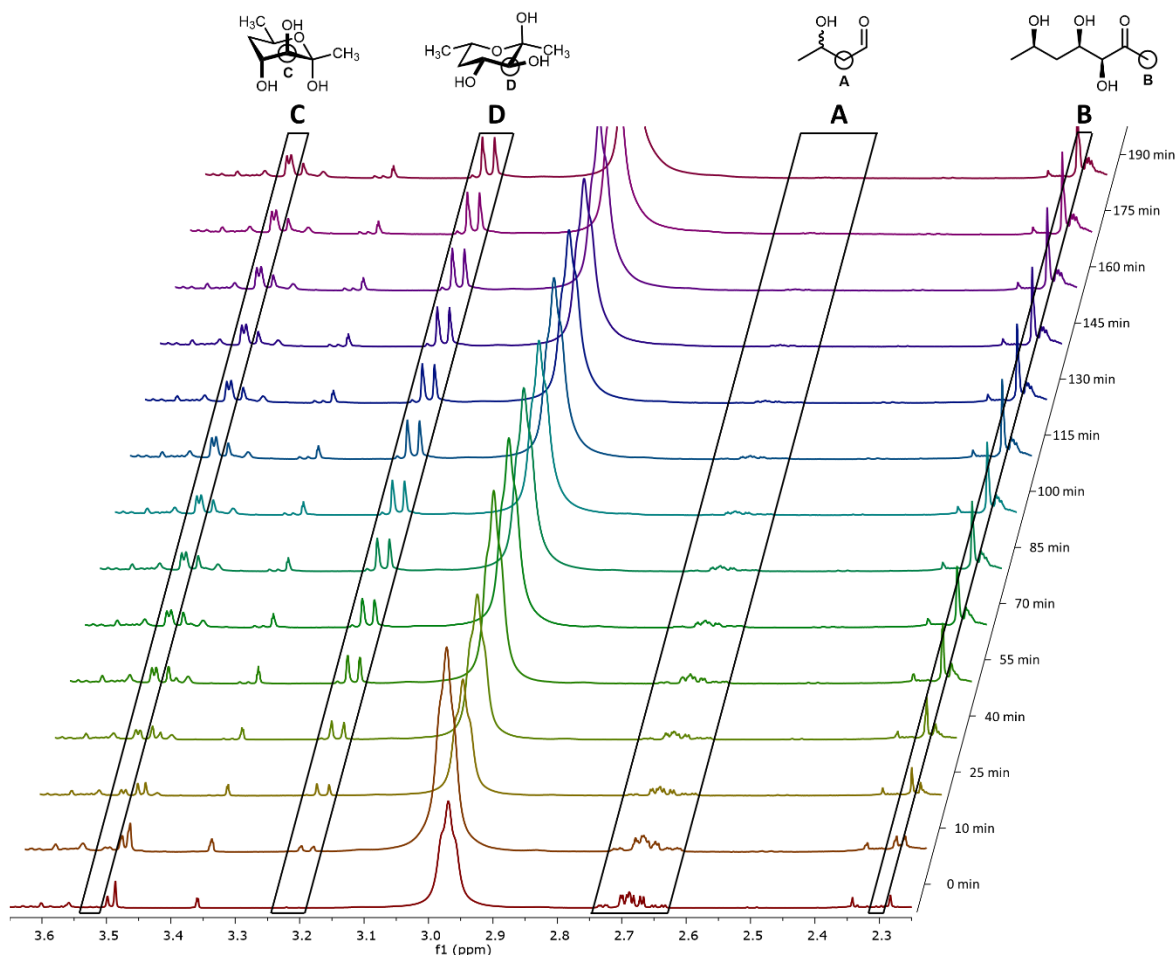


Abbildung 27. Untersuchung des Reaktionsverlaufs von *rac*-3-Hydroxybutanal (*rac*-8) mit drei Äquivalenten Hydroxyacetone unter FSA^{wt}-Katalyse anhand von ¹H-NMR-Spektren (500 MHz, D₂O). Protonensignale des Edukts (A), des (*R*)-Produkts (offenkettig: B; Ring: C) und des (*S*)-Produkts (offenkettig: nicht beobachtet, Ring: D) sind für die Auswertung hervorgehoben.

Aus den gemessenen Integralflächen des Edukts *rac*-8 (A) sowie den der gebildeten Produkte **159** (B und C) und **161** (D) wurde der jeweilige prozentuale Anteil bestimmt unter der Voraussetzung, dass während der Reaktion das Edukt stabil bleibt und keine Nebenreaktionen ablaufen. In Abbildung 28 sind die jeweiligen Edukt- (*rac*-8 in blau) sowie Produktanteile (**159** in schwarz und **161** in rot) über den zeitlichen Reaktionsverlauf dargestellt. Über die Datenpunkte der Bildung des jeweiligen Produkts wurde jeweils ein Michaelis-Menten-Fit gelegt (A) und aus dem jeweiligen Fit die Steigung zu Beginn der Reaktion abgeleitet, welche proportional zur Anfangsbildungsrate ist.

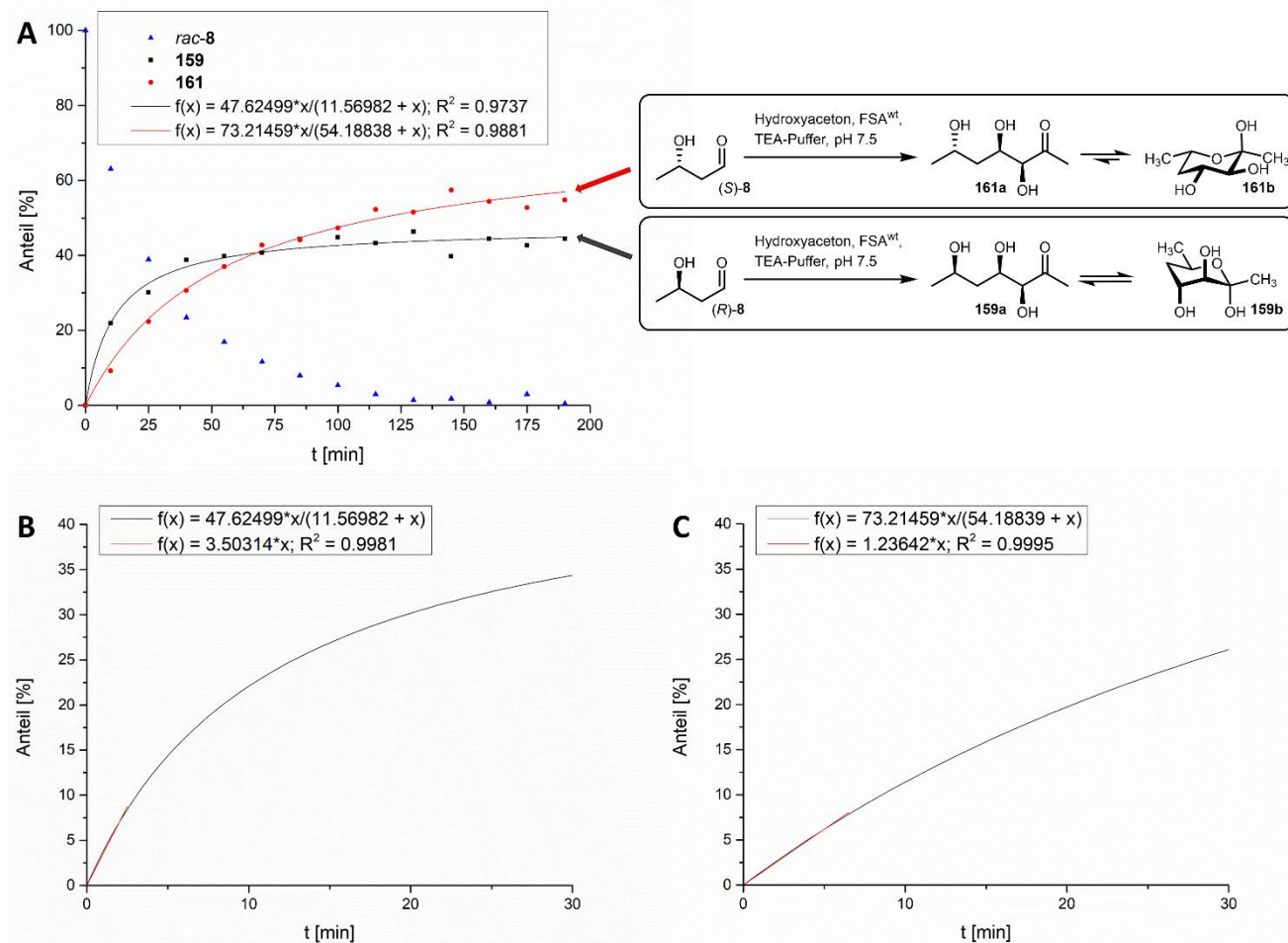


Abbildung 28. Bestimmung des Produktanteils von **159** und **161** über einen Reaktionszeitraum von 190 min. **A)** Anteil der gebildeten Produkte im zeitlichen Verlauf, bestimmt anhand charakteristischer $^1\text{H-NMR}$ Signale. Michaelis-Menten-Fits von **159** (**B**) sowie **161** (**C**).

Für **159** wurde eine Steigung von $b = 3.5 \text{ min}^{-1}$ (**B**) und für **161** eine Steigung von $b = 1.2 \text{ min}^{-1}$ (**C**) bestimmt. Da die Anfangsbildungsraten mittels dieser Methode nicht direkt bestimmt werden können, die Steigungen aber proportional zu diesen sind, lässt sich dennoch die relative Verbrauchssrate beider Enantiomere zueinander abschätzen. Es zeigt sich, dass das (*R*)-Enantiomer am Anfang etwa 2.8-fach schneller umgesetzt wird als das (*S*)-Enantiomer. Tatsächlich zeigt der Reaktionsverlauf in Abbildung 28 (**A**), dass die kinetische (*R*)-Enantioselektivität relativ rasch von einem Äquilibriumphänomen überlagert wird, das zugunsten des Produkts des (*S*)-Enantiomers tendiert. Nach 20 Tagen lagen beide Diastereomere in einem Gleichgewichtsverhältnis von 23:77 vor. Die gebildeten diastereomeren Addukte können zu Pyranoseringen zyklisieren, in denen die Hydroxygruppen in 3- und 4-Position entweder in axialer (**159**) oder äquatorialer (**161**) Position vorliegen können. Die Energiedifferenz zwischen diesen Formen verursacht die beobachtete thermodynamische Stereoselektivität. Diese Schlussfolgerung wird durch den Umstand verstärkt, dass **159** in wässriger Lösung eine 50:50-Mischung aus Ketten- und Ringform aufweist, während sich das Gleichgewicht für **161** fast ausschließlich auf der Seite der Ringform befindet.

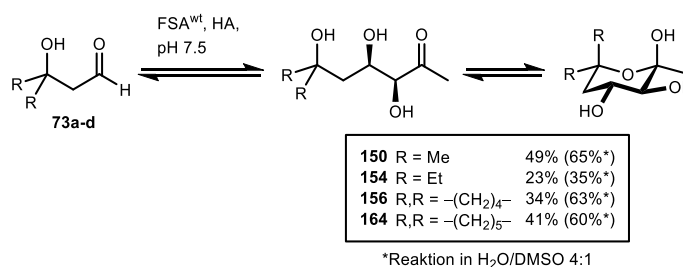
		Relative Destabilisierung [kJ/mol]
Wechselwirkung		
1,3 <i>syn</i>	$C_a : O_a$	10.50
	$O_a : O_a$	6.30
	$C_a : H_a$	3.78
	$O_a : H_a$	1.89
1,2 <i>gauche</i>	$O_1 : O_2$	1.48

Abbildung 29. Betrachtung des Einflusses möglicher Wechselwirkungen in **159** und **161** auf die relative Stabilität der Pyranoseform nach ANGVAL.^[171]

Mit Hilfe der empirischen Angyal-Parameter lässt sich rechnerisch ermitteln, welche Pyranoseform am stabilsten ist (Abbildung 29). Unter der Näherung, dass die O_1/O_2 sowie C_1/O_2 *gauche* Wechselwirkungen eine ähnliche relative Destabilisierung bewirken (genaugenommen sollte die C_1/O_2 -*gauche* Wechselwirkung einen größeren Einfluss haben), kann gezeigt werden, dass im Vergleich von **159** zu **161** netto eine O_a/H_a - (1.89 kJ/mol) sowie eine O_1/O_2 -Wechselwirkung (6.30 kJ/mol) überwiegen. Somit lässt sich erklären, warum trotz rechnerischer Stabilitätsdifferenz von ca. 8.2 kJ/mol trotzdem noch ein relativ hoher Gleichgewichtsanteil an der (*R*)-Komponente existiert.^[171] Die errechneten Ergebnisse weisen häufig von den im Experiment beobachteten Ergebnissen ab, wobei üblicherweise von Gleichgewichten ausgegangen wird, die stark auf Seiten der zyklischen Form liegen. Das hier aufgeführte Beispiel dient folglich nur für die Betrachtung der relativen Stabilitätsdifferenz zwischen **159** zu **161**, da **159** in einem relativ hohen Anteil an offenkettigem Substrat vorliegt. Der Literatur zufolge^[129] wurden mit **159** im Vergleich zu **161** mit anderen Donorsubstraten auch geringere Ausbeuten erzielt, was die hier dokumentierte Studie und Interpretation unterstützt.

3.2.4 Synthesen ausgehend von tertiären 3-Hydroxyaldehyden

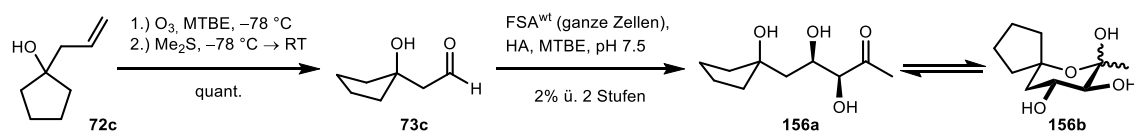
In einer früheren Arbeit wurde das Cyclopentylderivat **73c** in einer Aldolreaktion mit DHAP unter FruA-Katalyse umgesetzt.^[146] Da dieser relativ apolare 3-Hydroxyaldehyd erfolgreich verwendet wurde, lag es nahe, die Verwendbarkeit ähnlicher symmetrisch substituierter aliphatischer Aldehyde mit FSA-Varianten zu testen. Die Reihe symmetrischer tertiärer Hydroxyaldehyde wurde synthetisiert und mit HA oder DHA, unter Katalyse mit FSA^{wt} oder FSA^{A129S} inkubiert (Schema 60).



Schema 60. FSA^{wt}-katalysierte Umsetzung der tertiären 3-Hydroxyaldehyde **73a-d** mit Hydroxyacetone.

Die Produkte konnten ausgehend von den Substraten **73a-d** mit HA in Ausbeuten von 23–49% erhalten werden (Schema 60). Es zeigte sich der Trend, dass eine Erhöhung des sterischen Anspruchs sowohl zu einer langsameren Umsetzung, als auch zu niedrigeren Ausbeuten führte. Das Dimethylsubstituierte Produkt **150** wies mit 49% die höchste Ausbeute auf, beide zyklischen Produkte **156** und **164** hatten jeweils mit 34% und 41% geringe Ausbeuten. Die niedrigsten Ausbeuten wurden mit dem Diethylsubstituierten Produkt **154** bei 23% erhalten. Eine Erklärung, dass **154** im Vergleich zu beiden zyklischen Strukturen einen relativ niedrigen Umsatz aufwies, könnte darin bestehen, dass dessen Rotationsvolumen größer und somit der sterische Anspruch höher ist. Eine Erhöhung der Reaktionszeit für die Bildung von **154** und weiterer Zugabe von Enzym über den Reaktionsverlauf führten zu keinen nennenswert höheren Umsätzen.

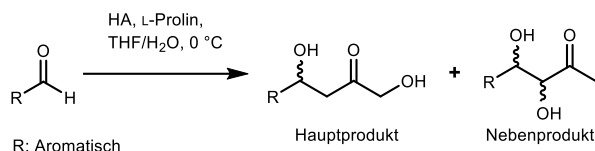
Wie bereits in Kapitel 3.1 beschrieben wurde während der Ozonolyse der Hydroxyallylverbindungen beobachtet, dass die gebildeten Produkte im Allgemeinen bei höheren Konzentrationen (i.d.R. ab 125–250 mM) in Wasser instabil waren. Mit zunehmendem sterischen Bedarf der aliphatischen Substituenten in β -Position des Aldehyds wird das Molekül hydrophober und damit in wässriger Lösung weniger löslich. Es ist bekannt, dass FSA Cosolventien wie DMF von bis zu 20 Vol.-% verträgt.^[43-44,47-48] Daher wurde der Zusatz von DMSO zur Erhöhung der Löslichkeit und Stabilität getestet. Die Substrate **73a-d** wurden daher in 20%iger DMSO-Lösung ozonisiert und anschließend in FSA-katalysierten Reaktionen getestet, wobei der Anteil an DMSO wiederum 20% betrug. Den Erwartungen entsprechend wurde ein Anstieg der Ausbeute beobachtet (Schema 60). Bemerkenswerterweise führen das Dimethylderivat **150** und die beiden zyklischen Komponenten **154** und **156** zu nahezu gleichen Ausbeuten um 60%, während das Diethylsubstituierte Produkt **164** mit 35% erneut die niedrigste Ausbeute ergab. Der einzige Nachteil beim Einsatz von schwersiedenden Lösungsmitteln wie DMSO und DMF besteht darin, dass diese schwieriger zu entfernen sind und Aspekte der grünen Chemie weniger berücksichtigt werden.



Schema 61. Ozonolyse der Hydroxyallylverbindung **72c** in MTBE und Aldolreaktion mit ganzen Zellen von FSA^{wt}.

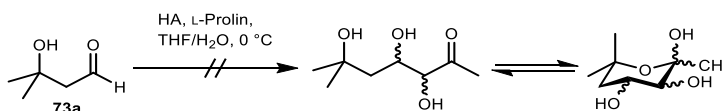
Zusätzlich zu den Reaktionen in wässrigen Medien wurde versucht, die FSA-katalysierte Reaktion mit ganzen Zellen durchzuführen. 1-Allylcyclopentan-1-ol (**72c**) wurde als Substrat ausgewählt, da mit diesem in Relation zu den anderen Verbindungen eine relativ gute Ausbeute erzielt wurde. Hierzu wurde die Hydroxyallylverbindung **72c** in MTBE ozonisiert und die MTBE-haltige Lösung direkt mit einer entsprechenden Menge an ganzen Zellen umgesetzt, die zur Expression der FSA^{wt} induziert worden waren. Bei der Reaktionskontrolle per DC ließ sich erkennen, dass das erwartete Reaktionsprodukt tatsächlich gebildet wird. Nach der Aufarbeitung konnte das Produkt in 2% Ausbeute erhalten werden. Aus diesem Versuch unter nicht-optimierten Reaktionsbedingungen lässt sich zumindest ableiten, dass die Reaktionen ebenfalls in ganzen Zellen funktionieren, die Ausbeuten jedoch verhältnismäßig geringer sind. Vorteilhaft ist hier, dass der 3-Hydroxyaldehyd **73c** nicht extra in die wässrige Phase überführt werden muss, was Ausbeuteverluste vermeidet und dass das Enzym nicht aufgereinigt werden muss, da hier direkt die rohe Zellmasse zum Einsatz kam. Ob größere, sperrigere Reste am Aldehyd durch die Zellmembran wandern können, muss noch gezeigt werden, wobei anzumerken ist, dass diese in MTBE nicht zwangsläufig stabil ist und somit durchlässig für die Substrate sein sollte.

Um die Diastereoselektivität der FSA zu prüfen, wurde versucht die potentiellen Produkte über alternative Wege mit Katalysatoren herzustellen, um Vergleichssubstanzen zu haben. Hierzu könnte 3-Hydroxy-3-methylbutanal (**73a**) z. B. organokatalytisch mit L-Prolin und Hydroxyaceton umgesetzt werden. Laut CHEN *et al.* können aromatische Aldehyde mittels Organokatalysatoren wie Prolin mit Hydroxyaceton umgesetzt werden.^[172] Als Hauptreaktion erfolgt jedoch die Aldoladdition über die Methylgruppe von Hydroxyaceton, während die Addition über die Hydroxymethylengruppe weniger häufig abläuft (Schema 62).



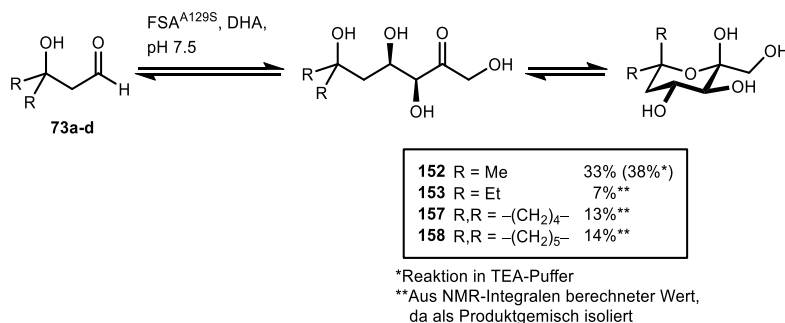
Schema 62. Umsetzung von Aldehyden mit Hydroxyaceton durch L-Prolin.^[172]

Diese Reaktion wurde in der Literatur nur mit aromatischen Aldehyden dokumentiert, während hier ein aliphatischer 3-Hydroxyaldehyd gebraucht wurde. Es wurden zwei Reaktionsansätze getestet mit jeweils 30 mol-% bzw. 130 mol-% Katalysator. Die Untersuchung der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie sowie HPLC und der Vergleich zu der Analytik aus der FSA-katalysierten Reaktion zeigten jedoch keinerlei Reaktionsumsatz (Schema 63).



Schema 63. Versuch der L-Prolin-katalysierten Umsetzung von 3-Hydroxy-3-methylbutanal (**73a**) mit Hydroxyaceton.

Ein Grund für das Misslingen der Reaktion liegt vermutlich darin, dass die von CHEN *et al.* getesteten aromatischen Aldehyde bessere elektrophile Eigenschaften als aliphatische Aldehyde aufweisen. Weitere exemplarische Versuche zur Synthese von Vergleichssubstanzen wurden nicht unternommen.



Schema 64. FSA^{A129S}-katalysierte Umsetzung der tertiären 3-Hydroxyaldehyde **73a-d** mit Dihydroxyaceton.

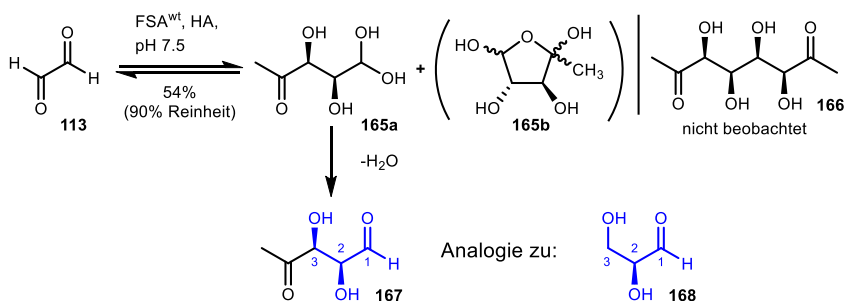
Wie bereits bei den Testreaktionen mit **73b** verliefen die Reaktionen der Substrate **73a-d** mit DHA unter FSA^{A129S}-Katalyse mit wesentlich langsamerer Umsatzgeschwindigkeit und führten damit zu geringeren Ausbeuten. Zudem gestaltete sich die Aufreinigung der Produkte als schwierig, da das aus DHA und Formaldehyd gebildete Nebenprodukt L-Erythrose nicht leicht abgetrennt werden konnte. Erschwert wurde dies durch eine ähnliche Polarität von Substrat und Nebenprodukt. Eine präparative Aufreinigung mittels HPLC gestaltete sich zudem schwierig, da die Substrate nicht UV-aktiv sind und Lösungsmittelgradienten daher „blind“ eingestellt werden mussten. Versuche zur Trennung des Zielsubstrats von L-Erythrose, DHA und DHA-Hydrat mittels Größenausschlusschromatographie und Säulenchromatographie (Kieselgel, AlOx, RP-18) führten

jeweils nicht zu einer zufriedenstellenden Trennung im Falle der Substrate **152**, **155**, **157** und **158**. Die Verbindungen wurden durch NMR-, HPLC- und HR-MS-Daten jedoch vollständig identifiziert. Die Ausbeute wurde aus isolierten Mischfraktionen berechnet und gibt einen Hinweis auf die Effektivität der FSA^{A129S}-katalysierten Reaktion. Bei den Ausbeuten wurde ein ähnlicher Trend wie bei den Reaktionen mit HA und FSA beobachtet. Während beim Dimethylderivat **152** die höchste Ausbeute von 38% erzielt wurde, wurden für die zyklischen Produkte **157** und **158** nur 13% bzw. 14% sowie im Fall des Diethylderivats **155** eine Ausbeute von 7% erhalten.

3.2.5 Synthesen ausgehend von linearen Dialdehyden und Intermediaten

Glyoxal (**113**), Glutardialdehyd (**144**) und *threo*-3,4-Dihydroxyhexandial ((±)-**70**) erwiesen sich im Screening als die einzigen linearen Dialdehyde, welche von der FSA^{wt} als Substrat akzeptiert wurden. Bernsteinsäuredialdehyd (**143**) konnte wegen seiner Polymerisationsneigung sowie potentiellen Verunreinigungen, welche möglicherweise inhibierend auf das Enzym wirken, nicht direkt verwendet werden. Da Malondialdehyd direkt polymerisieren würde, musste dieser entweder mehrstufig oder durch *in situ*-Generierung direkt umgesetzt werden.

Aufbauend auf den Ergebnissen des Reaktionsscreenings (Tabelle 21) wurde Glyoxal (**113**) im präparativen Maßstab mit Hydroxyaceton umgesetzt (Schema 56, oben).

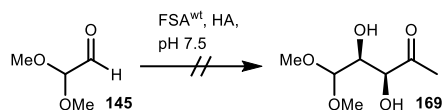


Schema 65. Reaktion von Glyoxal (**113**) mit Hydroxyaceton (oben). Strukturanalogie zwischen Aldehyd **167** und L-Glycerinaldehyd (**168**) (unten).

Interessanterweise zeigte die NMR-Analyse des Rohproduktes, dass keine Zweifachaddition von Hydroxyaceton stattgefunden hatte. Das bei der Reaktion gebildete Produkt konnte säulenchromatographisch isoliert werden, jedoch entstandene Nebenprodukte sowie Glyoxal (als Dihydrat) aufgrund ähnlicher Polaritäten nicht vollständig entfernt werden, trotz Verwendung diverser Laufmittelgemische. Die Auswertung der NMR-Spektren lässt darauf schließen, dass das Einfachadditionsprodukt eher unerwartet als Hydrat **165a** vorliegt, welches in 54% Ausbeute als Hauptprodukt identifiziert wurde, während das zyklische Produkt **165b** möglicherweise nur zu geringen Anteilen vorliegt. Es bestand Anlass zur Vermutung, dass im Fall des direkten Einsatzes von Glyoxal eine Inhibition des Enzyms eintritt, da hierdurch das Lysin im Aktiven Zentrum irreversibel blockiert werden könnte. In einem weiteren Test wurde daher Glyoxal (**113**) mittels einer Spritzenpumpe (0.04 eq/L) zur Reaktion zugegeben, wobei die FSA^{wt} vorher mit Hydroxyaceton gesättigt wurde. Dies sollte sicherstellen, dass das katalytisch aktive Lysin zur Verfügung steht, welches durch Glyoxal blockiert werden könnte. Bei der dosierten Zugabe von Glyoxal wurde, im Vergleich zur direkten Zugabe, kein Unterschied beobachtet. Vielmehr zeigte sich, dass nach etwa zwei Stunden Glyoxal akkumulierte und ebenfalls wieder nur das Einfachadditionsprodukt **167** (als Hydrat **165a**) isoliert wurde. Der gebildete Aldehyd **167** stimmt von

seinem Kohlenstoffgerüst bis C3 mit L-Glycerinaldehyd (**168**) überein, wobei beide Verbindungen (2S)-konfiguriert vorliegen (Schema 65, unten). RALE *et al.* haben gezeigt, dass sowohl L- als auch D-Glycerinaldehyd mit Hydroxyaceton gleich gut umgesetzt werden können (Tabelle 7).^[120] Aufgrund dieses Sachverhalts kann zumindest darauf geschlossen werden, dass die Stereoinformation der Hydroxygruppe in 2-Position nicht dafür verantwortlich ist, dass das Substrat nicht umgesetzt wurde.

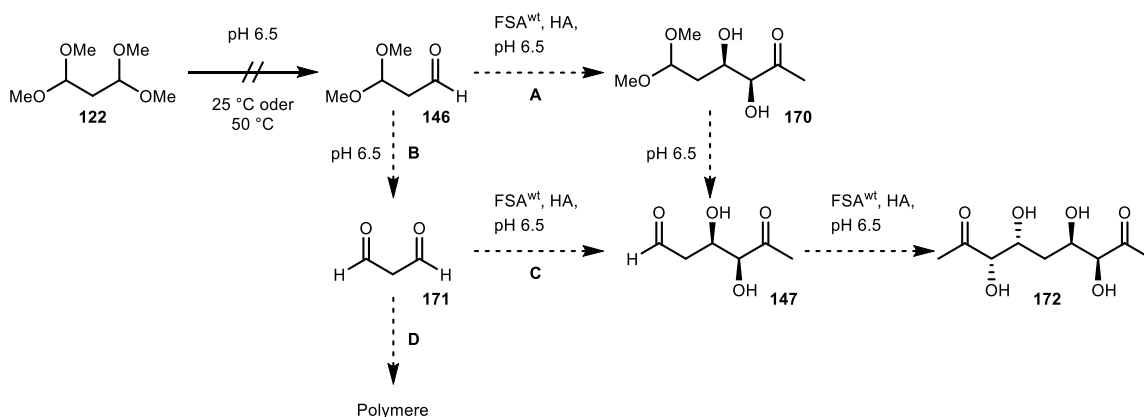
Um zu testen, ob die zweite Aldehydgruppe eine Inhibition des Enzyms begünstigt, wurde 2,2-Dimethoxyacetaldehyd (**145**) unter den gleichen Reaktionsbedingungen inkubiert (Schema 66).



Schema 66. Versuchte Umsetzung von Dimethoxyacetaldehyd (**145**) mit Hydroxyaceton katalysiert durch FSA^{wt}.

Bei der Reaktionskontrolle mittels HPLC konnten zwei neue Signale detektiert werden. Die genaue Untersuchung zeigte, dass das Dimethylacetal **145** in wässriger Lösung langsam zu Glyoxal (**113**) abreagiert. Durch Vergleich der HPLC-Analyse mit der Reaktion von Glyoxal (Schema 65) konnte eines der Signale zu Glyoxal und das andere Signal dem Monoadditionsprodukt **165a** zugeordnet werden. Eine Addition an das Dimethoxyacetal **145** hatte nicht stattgefunden. Ein Grund hierfür liegt vermutlich darin, dass das Dimethoxyacetal räumlich weitaus anspruchsvoller ist als die Aldehydgruppe (bzw. deren Hydrat) von Glyoxal (**113**), so dass das Substrat **145** nicht in einer reaktiven Orientierung in die Enzymtasche passt und daher keine Reaktion zu beobachten war.

Der nächstgrößere lineare Dialdehyd ist Malondialdehyd (**171**), welcher jedoch nicht als Reinsubstanz eingesetzt werden kann. Infolgedessen wurde versucht, diesen ausgehend von 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (**122**) *in situ* zu generieren und dann direkt enzymkatalysiert umzusetzen (Schema 67). FSA^{wt} kann in einem pH-Bereich von 5.5 bis 11.0 eingesetzt werden, ohne dass die katalytische Aktivität gravierend eingeschränkt wird.^[25] Die Acetalschutzgruppe kann hingegen nur im sauren Milieu effizient abgespalten werden, weshalb für die Reaktion ein pH-Wert von 6.5 gewählt wurde. Die Reaktion wurde einmal bei Raumtemperatur und einmal zur Beschleunigung bei 50 °C durchgeführt (Schema 67).

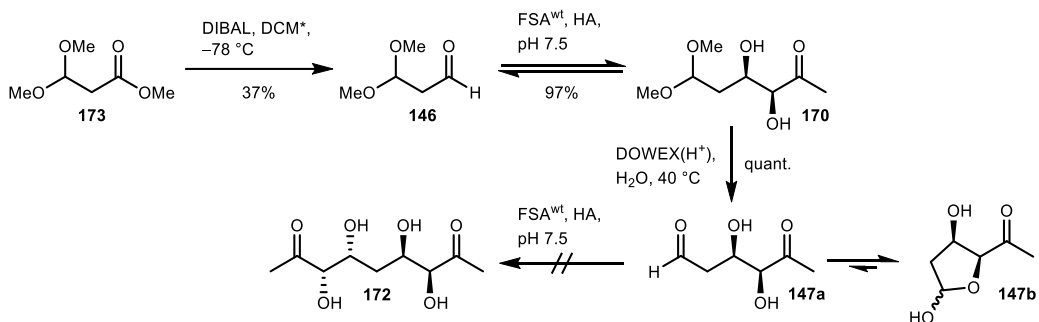


Schema 67. Konzept der *in situ*-Generierung von Malondialdehyd (**171**) im Sauren zur Umsetzung mit Hydroxyaceton.

Prinzipiell muss zuerst eine der Dimethoxyacetalgruppen zum Monoaldehyd **146** gespalten werden. Um zu gewährleisten, dass die Reaktion in Richtung zum Bis-Additionsprodukt **172** verläuft, sollte der erste

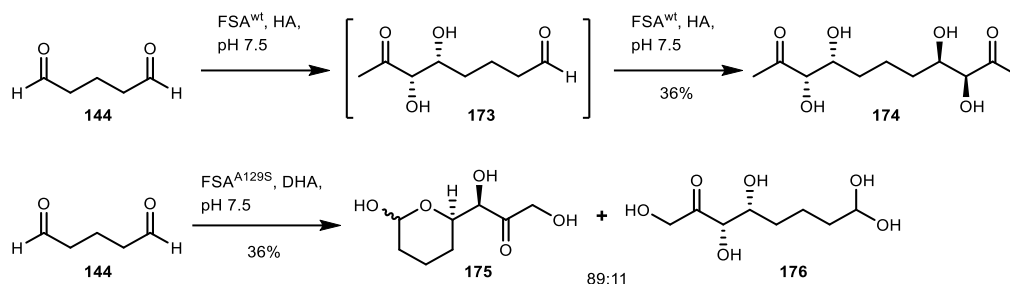
Additionsschritt **(A)** schneller verlaufen als die Spaltung der zweiten Acetalgruppe **(B)**. Wenn die Spaltung des zweiten Acetals **(B)** hingegen schneller verläuft, könnte Malondialdehyd (**171**) mit steigender Konzentration polymerisieren **(D)** und somit aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt werden, sofern die Addition an den Malondialdehyd (**171**) **(C)** nicht schnell genug ist. Die Polymere könnten eventuell inhibierend auf FSA^{wt} wirken, wodurch die Reaktion gestoppt würde. Bei beiden Testansätzen (25 °C bzw. 50 °C) konnte bei pH 6.5 keine Umsetzung des Bis-Acetals **172** beobachtet werden, da auch kein Monoaldehyd **147** mittels HPLC nachgewiesen werden konnte. Eine Verringerung des pH-Werts auf 6.0 oder 5.5 wurde zunächst nicht getestet. Es war zu befürchten, dass hierbei die katalytische Aktivität von FSA^{wt} soweit eingeschränkt wird, dass die Abspaltung beider Schutzgruppen schneller stattfindet **(B)** und die Polymerisation **(D)** überhandnimmt. Ein alternatives Substrat wäre noch 1,1,3,3-Tetraethoxypropan, bei dem die Schutzgruppe im Prinzip einfacher abzuspalten sein sollte. Diese Option wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch ebenfalls noch nicht getestet.

Um zu prüfen ob Malondialdehyd als C₃-Baustein Chancen hat von der FSA^{wt} umgesetzt zu werden, wurde reines 3,3-Dimethoxymalonaldehyd (**146**) inkubiert. Der Aldehyd war in 37% Ausbeute ausgehend von Methyl-3,3-dimethoxypropanoat (**173**) durch Reduktion mit DIBAL zugänglich (Schema 68). Die FSA^{wt}-katalysierte Addition von Hydroxyaceton erfolgte tatsächlich mit 97% Ausbeute. Die Abspaltung des Dimethoxyacetals erfolgte quantitativ, wobei der Aldehyd ohne weitere Aufreinigung direkt in Lösung weiterverwendet wurde. Beim Versuch einer zweiten Addition von Hydroxyaceton durch FSA^{wt} konnte jedoch kein Umsatz mehr beobachtet werden. Prinzipiell sollte das Substrat umgesetzt werden können, da es einen ähnlichen sterischen Anspruch hat wie die bereits erfolgreich genutzten 3-Hydroxyaldehyde. Eine Zersetzung des Aldehyds scheint unwahrscheinlich, da dieser mittels DC und HPLC identifiziert wurde und kein Eliminierungsprodukt zu beobachten war. Es besteht die Möglichkeit, dass die zyklische Form **147b** den Aldehyd maskieren könnte.



Schema 68. Versuch der sequenziellen Addition von Hydroxyaceton ausgehend von einseitig geschütztem Malondialdehyd **146**.

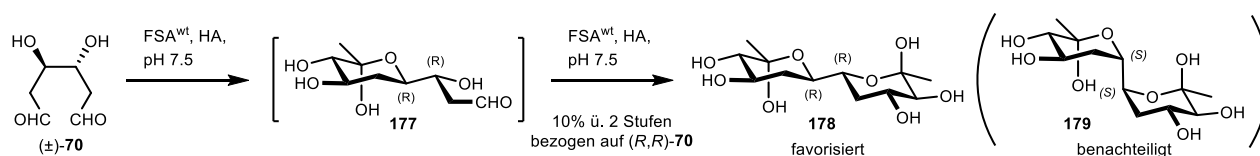
Allgemein ist bekannt, dass Glutardialdehyd als Quervernetzer in Enzymen auftreten kann (Kapitel 1.4). In den Reaktionsscreenings mit Glutardialdehyd wurde allerdings erstaunlicherweise ein Umsatz sowohl mit Hydroxyaceton als auch mit Dihydroxyaceton beobachtet, weshalb die Reaktionen auch im quantitativen Maßstab durchgeführt wurden (Schema 69).



Schema 69. FSA^{wt}- bzw. FSA^{A129S}-katalysierte Umsetzung von Glutardialdehyd (**144**) mit HA bzw. DHA.

Mit HA als Donor wurde bei der Verwendung von FSA^{wt} eine Tandem-Reaktion mit Glutardialdehyd (**144**) beobachtet, bei der **174** in 36% Ausbeute gebildet wurde. Während der Reaktionskontrolle mittels DC und HPLC wurde kein Monoadditions-Intermediat **173** detektiert. Dies spricht dafür, dass der zweite Additionsschritt schneller als der erste Additionsschritt erfolgen muss. Wird bei der Reaktion der Aldoldonor nur im Unterschuss zugegeben, so lässt sich nach kurzer Zeit im Massenspektrum das Produkt der ersten Addition nachweisen. Verblüffenderweise wurde bei der Reaktion von Glutardialdehyd (**144**) mit DHA und FSA^{A129S} im Gegensatz dazu nur das Monoadditionsprodukt in 36% Ausbeute erhalten, das als 89:11-Gemisch aus Lactol **175** und Hydrat **176** vorlag. Durch Anlegen eines dynamischen Vakuums über einen längeren Zeitraum konnte das kovalent gebundene Wasser des Ketonhydrats nicht entfernt und das Gleichgewicht vollständig zur Seite des Lactols **175** verschoben werden. Versuche mit einem Donoranteil von drei oder sechs Äquivalenten Hydroxyketondonor pro Aldehydgruppe ergaben jeweils ähnliche Ausbeuten, jedoch ebenfalls jeweils nur eine Einfachaddition. Durch eine längere Reaktionszeit konnte die Bildung des Bis-Addukts ebenfalls nicht erreicht werden.

threo-3,4-Dihydroxyhexandial ((±)-**70**) sollte aufgrund der beiden 3-Hydroxyaldehydgruppen nach einer Zweifachaddition in der Lage sein, doppelt zu zyklisieren. Wegen seiner C₂-Symmetrie und der bisäquatorialen Verbindung zwischen den Ringen sollte das Zweifachadditionsprodukt in doppeltgeschlossener Ringform einfache NMR-Spektren liefern und sich durch das typische Auftreten eines Pseudo-Quartetts für die axialen Protonen in Position 5 und 8 mit nahezu identischen geminalen und vicinalen Protonen eindeutig bestätigen lassen. Mit HA wurde tatsächlich mit dem racemischen Dialdehyd ((±)-**70**) ein singuläres Bisaddukt in 10% Ausbeute bezogen auf (*R,R*)-**70** isoliert (Schema 70).

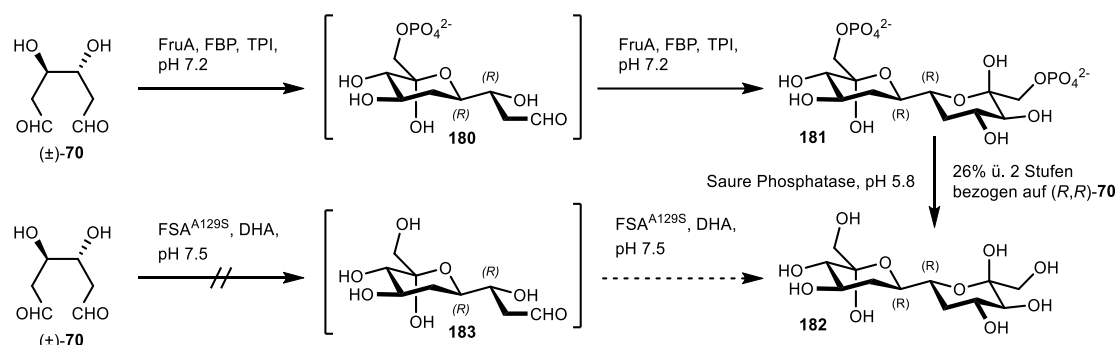


Schema 70. FSA^{wt}-katalysierte Umsetzung von (±)-3,4-Dihydroxyhexandial ((±)-**70**) mit HA.

Die NMR-Analyse des Produktgemischs zeigte, dass das C₂-symmetrische **178** gebildet wurde, wobei aufgrund des Gleichgewichts nebeneinander das doppelt offene, das halboffene und das doppeltzyklische Produkt beobachtet werden konnten. Der Doppelzyklus konnte dennoch zusätzlich in Reinform isoliert werden. Das Einfachadditionsprodukt **177** wurde während der Reaktion mittels DC- und HPLC-Analytik nicht beobachtet, was wie schon bei der Reaktion mit Glutardialdehyd (**144**) beobachtet dafürspricht, dass der zweite Additionsschritt, schneller als der erste verläuft. Die schrittweise Addition ließe sich, analog zur Reaktion von Glutardialdehyd (**144**), eventuell massenspektrometrisch nachweisen, sofern der Aldoldonor im Unterschuss zugegeben würde. Prinzipiell kann die Zweifachaddition auch an das (*S,S*)-Enantiomer stattfinden, aber eine Zyklisierung wäre aufgrund der ungünstigen Wechselwirkungen der beiden Kohlenhydratreste an der

Verknüpfungsstelle sterisch benachteiligt, da beide großen Substituenten an der C-glykosidischen Brücke jeweils axial ständen. Eine Einfachaddition wäre zwar noch denkbar, das entsprechende Produkt konnte jedoch nicht isoliert bzw. detektiert werden, um diese Überlegung zu untermauern.

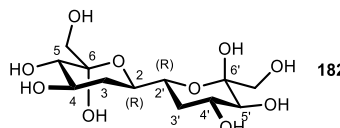
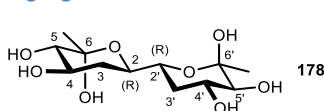
EYRISCH *et al.*^[110] konnten zeigen, dass, mit D-Fructose-1,6-bisphosphat (FBP), Triosephosphat Isomerase (TPI) und FruA als Katalysator, eine Zweifachaddition von DHAP an (\pm)-**70** stattfindet. Werden die Phosphatgruppen im Anschluss durch eine Phosphatase abgespalten, kann so **182** in zwei Schritten mit einer Ausbeute von 26% synthetisiert werden (Schema 71). Es wurde beobachtet, dass der erste Additionsschritt relativ langsam verläuft, gefolgt von einem schnellen zweiten Additionsschritt. Diese Beobachtung wurde durch die Tatsache untermauert, dass kein Monoaddukt als Intermediat nachgewiesen wurde. Analog wurde untersucht, ob FSA^{A129S} in einer einstufigen Tandemreaktion mit DHA das Substrat (\pm)-**70** umsetzen kann. Die Reaktion mit FSA^{A129S} und DHA zeigte hingegen nach DC- und HPLC-Analysen keinen Umsatz.



Schema 71. Oben: Zweistufige Umsetzung von (\pm)-3,4-Dihydroxyhexandial (\pm)-**70** katalysiert durch FruA.^[110] Unten: Versuch der einstufigen Umsetzung von (\pm)-**70** mit FSA^{A129S} und Dihydroxyaceton. FruA: D-Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase, FBP: D-Fructose-1,6-bisphosphat, TPI: Triosephosphat Isomerase.

Durch Vergleich der Verschiebung der NMR-Signale des Methylsubstituierten Produkts **178** mit dem von EYRISCH publizierten Hydroxymethylensubstituierten Produkt **182**^[110] (Tabelle 22) lässt sich abschließend das Konzept bestätigen, dass die C₂-symmetrischen Moleküle in Ringgeschlossener Form einfache NMR-Spektren ermöglichen.

Tabelle 22. Vergleich der NMR-Signale von **178** (links) mit **182** (rechts)^[110] zur Veranschaulichung, dass bei C₂-symmetrischen Dialdehyden als Ausgangsmaterial einfache NMR-Spektren erhalten werden.

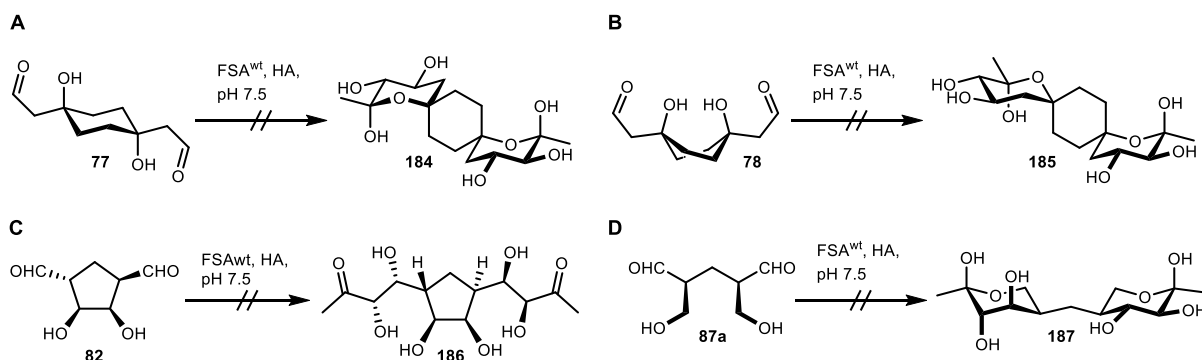


¹ H-NMR ^a [ppm]	¹³ C-NMR ^b [ppm]	¹ H-NMR ^c [ppm]	¹³ C-NMR ^d [ppm]
4.00–3.94 (m, 2H, H-2, H-2')	98.0 (C-6, C-6')	4.00 (d, 2H, H-2, H-2')	98.4 (C-6, C-6')
3.92 (ddd, J = 11.5, 9.5, 5.1 Hz, 2H, H-4, H-4')	76.8 (C-5, C-5')	3.97 (ddd, 2H, H-4, H-4')	72.5 (C-5, C-5')
3.25 (d, J = 9.5 Hz, 2H, H-5, H-5')	69.8 (C-2, C-2')	3.70 (d, 2H, CH _a H _b OH); 3.55 (d, 2H, CH _a H _b OH)	70.3 (C-2, C-2')
2.00 (ddd, J = 12.6, 5.2, 1.8 Hz, 2H, H-3 _{eq} , H-3' _{eq})	68.2 (C-4, C-4')	3.42 (d, 2H, H-5, H-5')	68.9 (C-4, C-4')
1.68–1.54 (m, 2H, H-3 _{ax} , H-3' _{ax})	34.7 (C-3, C-3')	1.97 (ddd, 2H, H-3 _{eq} , H-3' _{eq})	64.2 (2x CH ₂ OH)
1.50 (s, 6H, 2x CH ₃)	24.9 (2x CH ₃)	1.63 (q, 2H, H-3 _{ax} , H-3' _{ax})	34.9 (C-3, C-3')

^a300.1 MHz, D₂O; ^b75.5 MHz, D₂O; ^c400 MHz, D₂O; ^d100.6 MHz, D₂O.

3.2.6 Synthesen ausgehend von monozyklischen Bis-(3-hydroxyaldehyden)

Da sich bei den Ergebnissen der Reaktionen von Glutardialdehyd (**144**) und (\pm)-**70** zeigte, dass Hydroxyaceton ein besser geeignetes Nukleophil ist, wurden die folgenden Reaktionen mit FSA^{wt} und HA getestet. Beim Reaktionsscreening der Dialdehyde (Tabelle 21) bestand die Vermutung, dass die für potentiell aktiv befundenen Bis-3-hydroxyaldehyde **77**, **78**, **82** und **87a** im präparativen Maßstab umgesetzt werden können (Schema 72), obwohl die Ergebnisse des Reaktionsscreenings teils uneindeutig waren. Insbesondere wurden im Vergleich zu den strukturell einfacheren Mono-3-Hydroxyaldehyden keine definierten Signale, sondern breite Banden bei der Dünnschichtchromatographie beobachtet, welche auf eine Produktbildung hinweisen könnten.



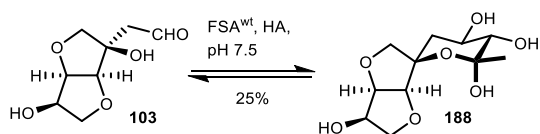
Schema 72. Versuch der FSA^{wt}-katalysierten Umsetzung von verzweigten und zyklischen Dialdehyden mit Hydroxyaceton.

Leider zeigte sich bei den Reaktionen, dass jeweils kein vollständiger Reaktionsumsatz stattfand. Die Reaktionen wurden daher nach drei Tagen abgebrochen und die Reaktionsgemische nach dem Lyophilisieren säulenchromatographisch aufgereinigt. Die NMR-spektroskopische Untersuchung der jeweiligen isolierten Säulenfraktionen ergab, dass wahrscheinlich auf dem Weg zu den Cyclohexan-Derivaten **184** und **185** nur eine Aldoladdition stattgefunden haben wird. Als Referenzpunkt dienten die charakteristischen ¹H-NMR-Signale der Protonen in 3-Position der neu gebildeten Zuckerstruktur (Kapitel 3.2.3.3), da diese Signale in einem ppm-Bereich erscheinen, der kaum von anderen Signalen überlagert wird. Es konnte in keiner der Fraktionen ein einheitliches, eindeutig definiertes Produkt identifiziert werden. Ursache hierfür sind komplexe Gleichgewichte zwischen Anomeren und Konformeren, welche zusätzlich durch Gleichgewichte zwischen offenkettiger und zyklischer Form erschwert werden. Dieser Sachverhalt deckt sich mit der Beobachtung breiter Flecke in der Dünnschichtchromatographie. Weiterhin konnten die oben genannten Referenzsignale in keiner der isolierten Fraktionen nachgewiesen werden, sodass diese Reaktionen als kritisch und nicht ergiebig betrachtet werden müssen.

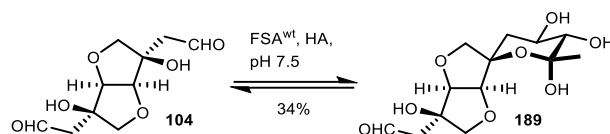
3.2.7 Synthesen ausgehend von polyzyklischen Mono- und Bis-(3-hydroxyaldehyden)

3.2.7.1 Synthesen ausgehend von bizyklischen Mono- und Bis-(3-hydroxyaldehyden)

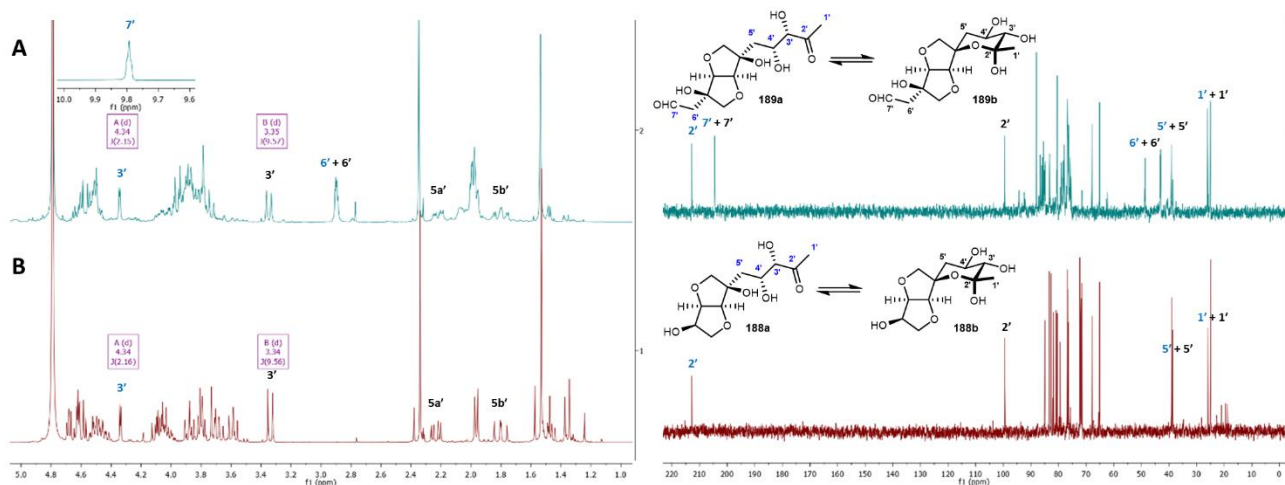
Bei den bizyklischen Aldehyden wurde vorab erwartet, dass diese aus sterischen Gründen langsamer umgesetzt werden als die linearen sowie monozyklischen Aldehyde und Produkte in niedrigeren Ausbeuten erhalten werden. Der Monoaldehyd **103** wurde durch FSA^{wt}-Katalyse mit Hydroxyaceton umgesetzt, wobei das Addukt in einer relativ guten Ausbeute von 25% Ausbeute erhalten werden konnte (Schema 73).

Schema 73. Umsetzung des Aldehyds **103** mit HA und FSA^{wt}.

Analog zum dem Monoaldehyd **103** wurde auch der Dialdehyd **104** mit HA im präparativen Maßstab umgesetzt, wobei für das isolierte Produkt eine Ausbeute von 34% erzielt wurde (Schema 74). Bei der dünnschichtchromatographischen Analyse wurden keine diskreten Flecken beobachtet, sondern nur eine breite Bande. Plausible Ursache ist hier das Gleichgewicht zwischen offenkettiger sowie zyklischer Form und deren anomeren Formen.

Schema 74. FSA^{wt}-katalysierte Umsetzung des Dialdehyds **104** mit HA.

Die Analyse der NMR-Spektren der isolierten Säulenfraktionen zeigte durch Vergleich zum Produkt **188**, dass nur eine Einfachaddition von HA stattgefunden hat (Abbildung 30).

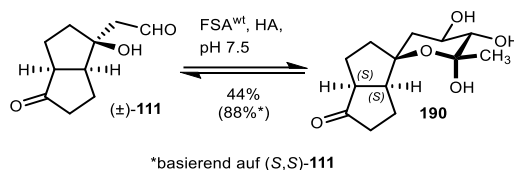
Abbildung 30. Vergleich der ¹H-NMR- (300.1 Hz, D₂O, links) und ¹³C-NMR-Spektren (75.5 Hz, D₂O, rechts) von **189** (A) mit **188** (B).

Im Vergleich der ¹H-NMR-Spektren von **189** und **188** ist zu erkennen, dass das gebildete Produkt die gleichen Dublettsignale des Protons in Position 3' enthält. Zudem sind die Signale für die beiden diastereotopen Protonen in Position 5' zu sehen. Diese Signale liegen jeweils als doppelter Satz vor, was dafürspricht, dass mindestens eine weitere zyklische Komponente vorliegt, wobei dies eventuell das α-Anomer oder Aldehydhydrat sein kann. Im Produktspektrum ist bei 9.77 ppm ein Triplet zu sehen, was für eine freie Aldehydgruppe spricht. Im ¹³C-NMR sind zusätzlich Carbonylsignale um 204.5 ppm zu erkennen, welche mit den Signalen um 49 ppm auf eine CH₂CHO-Funktionalität schließen lassen. Bei einer doppelten Addition würde, sofern das Produkt doppelt zyklisch vorliegt, ein C₂-symmetrisches Molekül gebildet werden, welches aufgrund der Symmetrie einen geringeren Signalsatz im NMR aufweisen müsste. Vergleicht man die Verschiebungen der Signale des unsymmetrischen Monozuckers **189** mit denen des gebildeten Produkts **188**, dann sind die

korrespondierenden Signalsätze für das D-Isomannitolgerüst im ^{13}C -NMR zu erkennen, sodass eindeutig von einer Einfachaddition ausgegangen werden muss.

Die beobachtete Einfachaddition am Dialdehyd **104** gibt im Rückblick auf die Reaktionen der vorigen vier Dialdehyde (Schema 72) Aufschluss über die Grenzen der FSA^{wt}-katalysierten Aldolreaktionen. Auch wenn die Analytikerggebnisse nicht eindeutig sind, lässt sich abschätzen, dass im Fall des linearen Dialdehyds **87a** noch eine Zweifachaddition möglich erscheint, während dies beim bicyklischen Dialdehyd **104** im Verhältnis zu den monozyklischen Dialdehyden **77**, **78** und **82** als umso unwahrscheinlicher scheint.

Als Analogon des bicyklischen Zuckervorläufers wurde der Aldehyd (\pm)-**111** durch FSA^{wt} mit HA, entgegen der Erwartung, dass für das hydrophobere Substrat (\pm)-**111** eine niedrigere Ausbeute erzielt wird, in 88% bezogen auf das (*S,S*)-Enantiomer erhalten (Schema 75). Verbindung **103** unterscheidet sich strukturell nur durch die beiden Sauerstoffatome in den beiden Ringsystemen sowie den Oxidationslevel an C6 des Bizeklus. Zuvor wurde angenommen, dass der enthaltene Sauerstoff im Ringsystem sowie die zusätzlichen Hydroxygruppe sowohl die Löslichkeit in Wasser als auch die Möglichkeit zur Ausbildung sekundärer Wasserstoffbrücken zum Protein beeinflussen und damit den Reaktionsumsatz steigern. Wegen dieser Beobachtung ist davon auszugehen, dass andere Faktoren wie Sterik, hydrophobe Interaktionen sowie entropische und enthalpische Beiträge bei der Protein-Substrat-Interaktion den Reaktionsverlauf bedingt haben könnten. Analog lässt sich für Verbindung (\pm)-**111** argumentieren, dass diese aufgrund ihres aliphatischen Gerüsts eher hydrophobe Wechselwirkungen bevorzugt, die zu einer ungeeigneten Konformation bei der Bindung im aktiven Zentrum führen können, wobei entgegen dieses Arguments hier der bessere Umsatz detektiert wurde. Umso wahrscheinlicher jedoch scheint die Beobachtung auf unterschiedliche Substratkonzentration aus dem Ozonolyseschritt zurückzuführen sein (siehe Kapitel 3.1.1).



Schema 75. Umsetzung des Aldehyds (\pm)-**111** mit HA und FSA^{wt}.

Da der Aldehyd (\pm)-**111** als Enantiomergemisch eingesetzt wurde, stellte sich die Frage, welches Isomer umgesetzt worden war. HPLC-Daten und NMR-Spektren wiesen darauf hin, dass selektiv nur eines der Enantiomere reagiert hatte, da im ^{13}C -NMR-Spektrum nur ein Produkt mit zwei Signalsätzen von jeweils 13 Signalen detektiert wurde jeweils für das offenkettige und das ringgeschlossene Produkt. Um herauszufinden, welches der beiden Enantiomere umgesetzt wurde, wurden die erhaltenen Kopplungskonstanten aus dem NMR-Spektrum mit den zu erwartenden Kopplungskonstanten des (*R,R*)- und des (*S,S*)-Substrat mit den Daten des auf D-Isomannitol basierten Zuckers verglichen, welcher die gleiche räumliche Struktur am Bizeklus aufweist wie das (*S,S*)-Isomer (Abbildung 31).

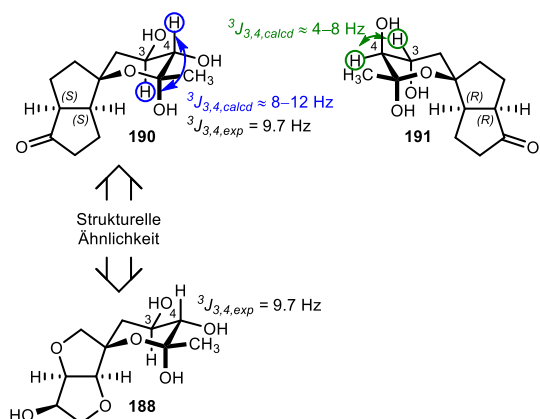
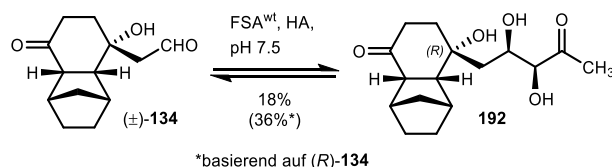


Abbildung 31. Vergleich der theoretischen ($^3J_{3,4,calc}$) und beobachteten ($^3J_{3,4,exp}$) Kopplungskonstanten der Protonen in Position 3 und 4 von **190** und **191** mit dem auf D-Isomannitol basierten Substrat **188**.

Beim Vergleich der Strukturen sollte der ringgeschlossene Zucker **190** für die 3J -Kopplung der Protonen zwischen Position 3 und 4 wegen der axialen Position der beiden Protonen eine Kopplungskonstante zwischen 8–12 Hz besitzen, während der Zucker **191** für die beiden Protonen eine Kopplungskonstante von 4–8 Hz aufweisen müsste. Für das Proton in 3-Position von **190** wurde eine Kopplungskonstante von $^3J_{3,4,beob}(\mathbf{190}) = 9.7\text{ Hz}$ ermittelt, welche perfekt mit der gemessenen Kopplungskonstante des D-Isomannitolderivats **188** von $^3J_{3,4,beob}(\mathbf{188}) = 9.7\text{ Hz}$ übereinstimmt. Dies spricht dafür, dass sich beide Hydroxygruppen in äquatorialer Position befinden, was mit den anderen in dieser Arbeit beschriebenen Pyranosestrukturen übereinstimmt.

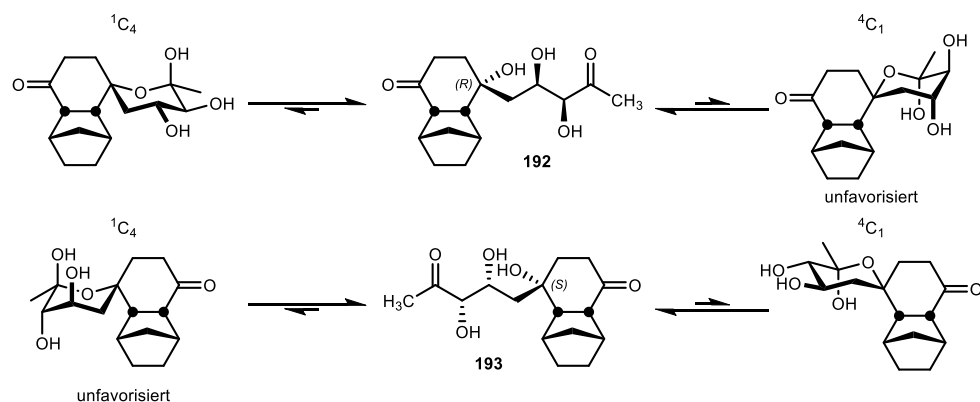
3.2.7.2 Synthesen ausgehend von trizyklischen 3-Hydroxyaldehyden

Der Aldehyd (\pm)-**134** stellt das bislang sperrigste getestete Substrat dar. Die Reaktion mit HA und FSA^{wt} ergab das Produkt **192** dennoch in einer Ausbeute von 18% (Schema 76).



Schema 76. Vermutete Umsetzung des Aldehyds (\pm)-**134** mit HA und FSA^{wt}.

Da das Produkt in Lösung unerwartet stark auf Seiten des offenen Substrats liegt und der Aldehyd als Racemat eingesetzt wurde, lässt sich nicht eindeutig ermitteln, welches der beiden Enantiomere bevorzugt abreagiert hatte. Eine hinreichende Begründung für das Fehlen der zyklischen Form lässt sich teilweise aus der Desoxyzuckerstruktur ableiten (Schema 77). Bei Betrachtung beider möglichen Reaktionsprodukte können diese theoretisch jeweils offenkettig und als 1C_4 - sowie 4C_1 -Konformer vorliegen. Das 4C_1 -Konformer von **192** sowie das 1C_4 -Konformer von **193** wären wegen der beiden axial ständigen Hydroxygruppen energetisch benachteiligt und daher stark unfavorisiert. Währenddessen wären das 1C_4 -Konformer von **192** und das 4C_1 -Konformer von **193** laut 3D-Kugel-Stab-Modellen unter Energieminimierung mit den Programmen Chem3D und MolView potentiell möglich, da hier die sterische Hinderung in beiden Konformeren nicht stark ausgeprägt scheinen. Genauere Untersuchungen wären jedoch notwendig, um eindeutige Aussage machen zu können, warum keine zyklische, sondern ausschließlich die offenkettige Spezies detektiert wurde.



Schema 77. Mögliche Gleichgewichtslage zwischen der offenkettigen Form und den zyklischen Konformeren von **192** (oben) und **193** (unten).

Während der Reaktion wurde mittels HPLC-Analyse und NMR-Spektroskopie nur die Bildung eines Produkts beobachtet und im Einklang mit Beobachtung bei den bizyklischen Substraten **188** und **190** ist scheint es wahrscheinlich, dass das (*R*)-Produkt gebildet wurde, welches dann folglich in 36% Ausbeute bezogen auf (*R*)-**134** erhalten wurde.

Falls die obige Hypothese stimmen sollte, dann scheint der Wildtyp der FSA eine Präferenz für ein bestimmtes Enantiomer von bi- und trizyklischen Substraten aufzuweisen. Im Einklang mit den vorher diskutierten Ergebnissen scheint die Präferenz dabei auf 3-Hydroxyaldehyde mit größeren Resten auf der rechten Seite abzielen (Abbildung 32).

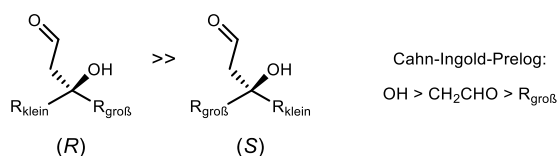
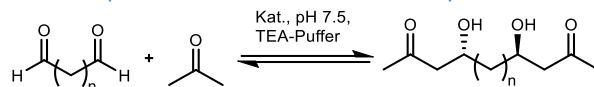


Abbildung 32. Vermutete Enantiomerenpräferenz von FSA^{wt} basierend auf Größe der Substituenten.

Um diese Hypothese zu überprüfen, könnte L-Isomannitol analog in die gespiegelten Aldehyde von **103** und **104** überführt und getestet werden, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr überprüft werden konnte.

3.2.8 Tests zur Umsetzung linearer Dialdehyde mit Aceton durch FSA^{D6H} und DERA^{F200I}

Aufbauend auf den FSA-katalysierten Tandemreaktionen mit Dialdehyden (Kapitel 3.2.5) wurden verschiedene DERA- und FSA-Varianten auf die Möglichkeit zur Ein- oder Mehrfachaddition von Aceton an lineare Dialdehyde getestet. DERA^{F200I} und FSA^{D6H} wurden als diejenigen Varianten ausgewählt, welche bekanntermaßen Aceton an bestimmte Aldehyde addieren können. Als lineare Dialdehyde wurden Glyoxal (**113**), Bernsteinsäuredialdehyd (**144**) und Glutardialdehyd (**144**) gewählt. Die Testreaktionen wurden im Volumen von 500 µL mit einer Substratkonzentration von 50 mM (entspricht einer effektiven Aldehydfunktionskonzentration von 100 mM) und einer Donorkonzentration von 150 mM durchgeführt. Die Reaktionen wurden bei 25 °C in Triethanolamin-Puffer (TEA) bei pH 7.5 durchgeführt. Zusätzlich wurden Blindreaktionen ohne Zugabe von Enzym getestet. Nach 0.5, 1, 2, 4, 6 und 24 Stunden wurden HPLC-Proben vermessen. Nach 24 Stunden wurden die Reaktionen mittels DC kontrolliert. Die Produktbildung wurde anhand von neu gebildeten Spots auf der DC bzw. neu gebildeter Signale in der HPLC ausgemacht. Die Ergebnisse des Screenings sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

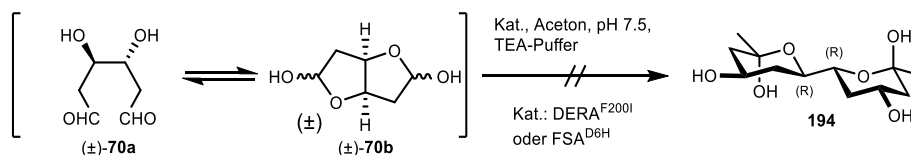
Tabelle 23. DERA- und FSA-katalysierte Testreaktionen von Dialdehyden mit Aceton oder Hydroxyaceton.

n	Katalysator	DC ^a	HPLC ^b
0	DERA ^{F200I}	–	–
0	FSA ^{D6H}	–	–
2 ^c	DERA ^{F200I}	–	–
2 ^c	FSA ^{D6H}	–	–
3	DERA ^{F200I}	–	–
3	FSA ^{D6H}	–	–

Die Reaktionen wurden in 500 µL Gesamtvolumen mit 150 mM Donor, 50 mM Akzeptor, 25 mM TEA-Puffer, pH 7.5, 25 °C und 1.5 mg Enzym durchgeführt; –: Keine Veränderung (DC, HPLC); ^aAnfärbung mit Anisaldehydreagenz. ^bKontrolle nach 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 h; ^cDie Testreaktion wurde mit einer Stammlösung von Bernsteinsäuredialdehyd aus der Reaktion mit DOWEX(H⁺) und als Reinsubstanz nach der Destillation verwendet (Schema 56).

Auffallend ist, dass bei den Reaktionen mit DERA^{F200I} sowie FSA^{D6H} kein nennenswerter Umsatz zu beobachten war. Bei DERA^{F200I} könnte die Beobachtung darauf zurückzuführen sein, dass die Dialdehyde als Quervernetzer agieren und somit zu einer Inhibition des Enzyms führen. Bei FSA^{D6H} hingegen sollte eine Inhibition weniger wahrscheinlich sein, da diese FSA-Variante auf der FSA^{wt} basiert, welche zumindest mit Glutardialdehyd eine glatte Reaktion katalysiert hatte (Kapitel 3.2.5). Es besteht die Möglichkeit, dass lineare, aliphatische Dialdehyde allgemein keine guten Aldolakzeptoren für FSA^{D6H} sind, die Produkte mangels zyklischer Stabilisierung nicht stabil sind und Aceton daher nur in geringen Umsatzraten addiert wurde. Dass bei Bernsteinsäuredialdehyd (**143**) kein Umsatz zu beobachten war, kann unter anderem daran liegen, dass die Substratkonzentration sehr gering war. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass bei beiden Syntheserouten Nebenprodukte gebildet wurden, die die Enzymaktivität gestört haben. Zudem ist nicht auszuschließen, dass Bernsteinsäuredialdehyd (**143**) durch Quervernetzung als Enzyminhibitor wirkt. Es besteht außerdem die plausible Möglichkeit, dass **143** in geringen Mengen zum BSA (**59**) oxidiert wurde. Wie in Kapitel 3.2.5 nachgewiesen wirkt BSA schon in geringen Konzentrationen inhibitorisch auf die FSA, konnte allerdings hier mittels HPLC nicht direkt nachgewiesen werden. Im Fall von DERA^{F200I} ist der Semialdehyd jedoch ein hervorragendes Substrat in der Aldolreaktion mit Aceton (Kapitel 4.2.1, Tabelle 27), wogegen bei Bernsteinsäuredialdehyd (**143**) kein Umsatz zu erkennen war. Dies spricht eher für eine zu geringe Konzentration an Dialdehyd bzw. dessen Zersetzung bei der Präparation der wässrigen Lösung als Hauptursache für das Scheitern der Reaktion.

Angeregt durch die FSA^{wt}- und FSA^{A129S}-katalysierten Reaktionen von (±)-3,4-Dihydroxyhexandial ((±)-**70**) mit Hydroxyaceton bzw. Dihydroxyaceton wurde ebenfalls versucht, den diesen Dialdehyd unter Katalyse von DERA^{F200I} oder FSA^{D6H} mit Aceton umzusetzen.

**Schema 78.** DERA^{F200I} und FSA^{D6H}-katalysierte Testreaktionen von (±)-3,4-Dihydroxyhexandial ((±)-**70**) mit Aceton. Das Zielprodukt ist in β-Anomerform dargestellt.

DC- und HPLC-Untersuchungen zeigten jedoch ähnlich den Beobachtungen bei den linearen Dialdehyden keine Produktbildung.

3.3 Zusammenfassung und Ausblick – FSA

Aldolasen sind in der Natur für die asymmetrische Synthese multifunktionaler chiraler Moleküle zuständig, wobei die Ausbildung von chiralen Zentren üblicherweise stereospezifisch erfolgt. Die meisten Aldolasen, und insbesondere die FSA, tolerieren eine breite Varianz an Akzeptormolekülen. Da mit der FSA bisher nur einfache, sterisch wenig anspruchsvolle Aldolakzeptoren zur Synthese eingesetzt wurden, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwiefern sich das Akzeptorspektrum erweitern lässt. In Kapitel 3.2 wurden deshalb neue lineare sowie tertiäre Desoxyzucker mittels Katalyse durch FSA und deren Varianten hergestellt und charakterisiert, wobei der Fokus auf C–C-Knüpfungsreaktionen mit 3-Hydroxyaldehyden lag. Letztere wurden zuvor systematisch als Aldolakzeptoren hergestellt und dann mit den ausgewählten Aldoldonoren HA und DHA in einer Aldolreaktion zu den entsprechenden Desoxyzuckern unter Verwendung von FSA^{wt} oder FSA^{A129S} umgesetzt. Weiterhin sollte geprüft werden, inwiefern die FSA tolerant gegenüber Dialdehyden ist und ob es möglich ist, Tandem-Reaktionen mit diesen durchzuführen. Im Fall positiver Testergebnisse wurden die Reaktionsprodukte im präparativen Maßstab hergestellt und im Nachfolgenden charakterisiert. Im Anschluss daran war es von Interesse zu untersuchen, ob sich die zuvor gemachten Beobachtungen auf weitere Aldolasen übertragen lassen. Der Fokus lag hierbei insbesondere auf unpolaren Aldoldonoren wie Aceton und deren Möglichkeit zur Umsetzung mit diversen Aldehyden. Letzteres ist von Interesse um das Anwendungsspektrum von Aldolasen in der chemischen Synthese vorteilhaft zu erweitern.

In Tabelle 24 sind die in dieser Arbeit neu hergestellten Produkte zusammengefasst. Es konnten erfolgreich 21 neue Verbindungen mit Hilfe der FSA-gestützten Synthese erhalten werden. Obwohl die Reaktionsbedingungen nicht optimiert sind, wurden z. T. sehr gute Ergebnisse erzielt. Zwar sind die Ausbeuten zum Großteil niedrig und verbesserungswürdig, aber Faktoren wie ungünstige Gleichgewichtslagen, hoher sterischer Raumbedarf der Substrate sowie Trennprobleme wegen Nebenproduktbildung und ähnlicher Polaritäten erfordern individuelle Lösungen, die im Rahmen der vorliegenden explorativen Studie noch nicht konsequent angegangen werden konnten.

Tabelle 24. Synthetisierte Aldolprodukte durch FSA^{wt}- oder FSA^{A129S}-Katalyse.

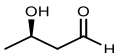
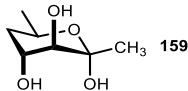
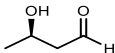
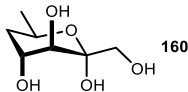
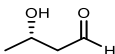
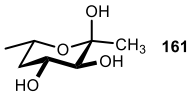
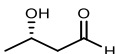
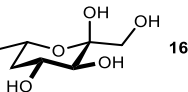
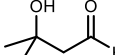
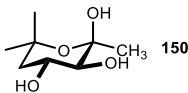
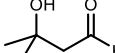
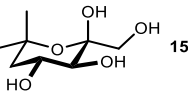
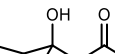
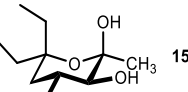
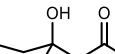
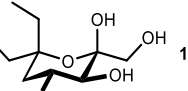
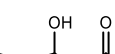
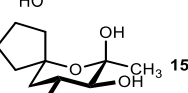
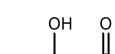
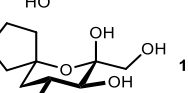
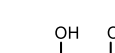
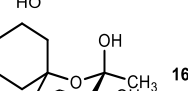
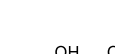
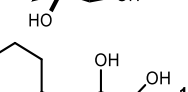
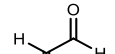
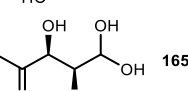
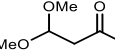
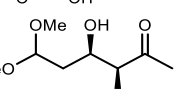

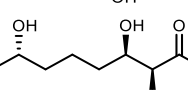
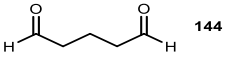
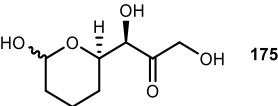
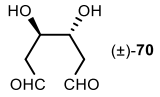
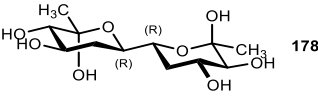
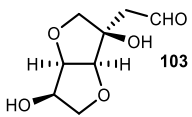
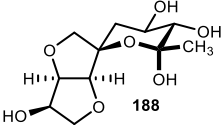
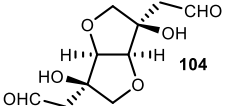
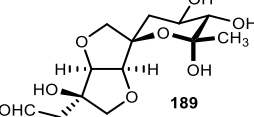
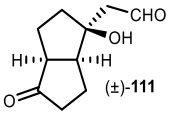
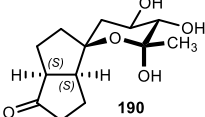
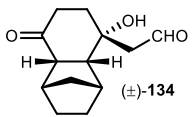
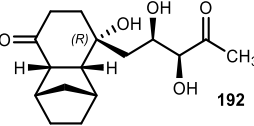
#	Akzeptor	Donor	Produkt	Ausbeute ^a
1	 (R)-8	HA ^b	 159	50%
2	 (R)-8	DHA ^c	 160	28%
3	 (S)-8	HA ^b	 161	76%
4	 (S)-8	DHA ^c	 162	50% (100% ^d)
5	 73a	HA ^b	 150	49%; 65% ^e
6	 73a	DHA ^c	 152	36%
7	 73b	HA ^b	 154	23%; 35% ^e
8	 73b	DHA ^c	 155	7% ^f
9	 73c	HA ^b	 156	34%; 63% ^e
10	 73c	DHA ^c	 157	13% ^f
11	 73d	HA ^b	 164	41%; 60% ^e
12	 73d	DHA ^c	 158	13% ^f
13	 113	HA ^b	 165a	54%
14	 146	HA ^b	 170	97%
15	 144	HA ^b	 174	36%

Tabelle 24. (fortgesetzt)

#	Akzeptor	Donor	Produkt	Ausbeute ^a
16	 144	DHA ^c	 175	36% ^g
17	 (±)-70	HA ^b	 178	10% ^h
18	 103	HA ^b	 188	25%
19	 104	HA ^b	 189	34% ⁱ
20	 (±)-111	HA ^b	 190	44%(88% ^k)
21	 (±)-134	HA ^b	 192	18%

^aBei den 3-Hydroxyaldehyden über zwei Stufen. Die Reaktionen und Aufreinigungen sind nicht optimiert; ^bReaktionen katalysiert durch FSA^{wt}; ^cReaktionen katalysiert durch FSA^{A129S}; ^dbezogen auf den Verbrauch von DHA; ^eReaktion in 20% DMSO; ^fberechnet aus isolierten Fraktionen, welche L-Erythrose, DHA und DHA-Hydrat enthielten; ^gisoliert als Gemisch des Mono-Addukts **175** und des Hydrats **176** im Verhältnis 89:11; ^hbezogen auf (R,R)-Isomer; ⁱberechnet aus unreinen, isolierten Fraktionen; ^kbezogen auf (S,S)-Isomer.

Das gesetzte Ziel der FSA-katalysierten Synthese neuartiger Desoxyzucker durch Einzel- und Tandemaldoladditionen konnte dahingehend erfüllt werden, dass eine Palette strukturell vielseitiger Moleküle erhalten wurde. Das Anwendungsspektrum der FSA^{wt} und der Variante FSA^{A129S} wurde damit insbesondere auf sperrige 3-Hydroxyaldehyde als elektrophile Substrate erweitert. Ausgehend von sterisch anspruchslosen 3-Hydroxyaldehyden konnte systematisch der sterische Anspruch von langkettigen aliphatischen Resten über monozyklische hin zu trizyklischen Aldehyden gesteigert werden, soweit diese Substrate von der FSA^{wt} noch problemlos mit HA umgesetzt werden können. Im Vergleich dazu stellte sich die Addition von DHA mit FSA^{A129S} als deutlich problematischer heraus, da im Vergleich zum Wildtyp mit steigendem sterischen Anspruch ein geringerer bzw. ab den Bicyklen praktisch kein Umsatz mehr zu beobachten war. Eine sinnvolle Perspektive ist in der Suche nach stabilen FSA^{A129S}-Varianten zu sehen, welche einen größeren Raum für die Aldolakzeptoren im aktiven Zentrum bieten. Wichtig bei solchen Varianten ist allerdings die Bedingung, dass die Diastereoselektivität des Additionsschritts erhalten bleiben muss.

Die anfänglichen Schwierigkeiten in der Handhabung sterisch anspruchsvoller 3-Hydroxyaldehyde konnten soweit in den Griff gebracht werden, dass diese bei den präparativen Reaktionen zu zufriedenstellenden Ergebnissen führten. Selbst unter den bisher nicht optimierten Reaktionen konnte ein Großteil der sterisch anspruchsvollen Substrate produktwirksam umgesetzt werden. Auffällig war, dass der Diethyl-substituierte

3-Hydroxyaldehyd **73b** im Vergleich zu den rigiden zyklischen Analoga sowohl mit der FSA^{wt} als auch mit der FSA^{A129S} deutlich niedrigere Umsatzraten erzielte. Offenbar behindern die konformativ flexiblen aliphatischen Reste das Eindringen des Aldehyds in die Enzymtasche im Vergleich zu den zyklischen Verbindungen, was sich in längeren Reaktionszeiten bemerkbar macht. Da aber längere Reaktionszeiten alleine zu keiner signifikanten Erhöhung der Ausbeute führten, müssten künftige Studien klären, welche Mechanismen und besondere Strukturmerkmale bei der FSA zu verringertem Umsatz führen. Die hier eingesetzten Aldoldonoren weisen zudem kinetische Unterschiede in ihren nukleophilen Eigenschaften auf: In der Aldol- und Retroaldolreaktion von DHA (mit FSA^{A129S}: $K_M = 11 \pm 1 \text{ mM}^{-1}$, $k_{\text{cat}} = 760 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_M = 69 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)^[47] im Vergleich zu HA (mit FSA^{wt}: $K_M = 17.4 \pm 0.5 \text{ mM}^{-1}$, $k_{\text{cat}} = 2527 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_M = 145 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)^[47] mit D-Glycerinaldehyd-3-phosphat besitzt ersteres eine höhere Affinität zum Katalysator, ist aber dagegen weniger aktiv. Es spielen zudem auch noch stabilisatorische und elektronische Faktoren der Produkte eine Rolle, die möglicherweise auch eine Erklärung für die geringen Umsatzraten liefern. Da die Reaktionen ohne internen Standard durchgeführt wurden, kann keine absolute Aussage bezüglich der Umsatzraten gemacht werden. Nichtsdestotrotz lässt sich sagen, dass die Reaktionen mit DHA und der FSA^{A129S} eine langsamere Umsatzrate als die Reaktionen mit HA und der FSA^{wt} aufweisen. Da sich in beiden Fällen nach einer gewissen Zeit eine Stagnation des Umsatzes beobachten ließ, welcher sich weder durch Erhöhen der Reaktionszeit, noch durch weiteren Zusatz von Enzym und/oder Donorsubstrat steigern ließ, ist eine gemeinsame kinetische Ursache zu vermuten, die entweder in der Substratstruktur oder den proteinkatalysierten Schritten begründet ist, während thermodynamische Ursachen aus der Gleichgewichtsnatur der Aldolreaktion auszuschließen sind.

Anhand der Versuche mit DMSO als Cosolvens konnte eine Ausbeutensteigerung von bis zu 26 Prozentpunkten beobachtet werden. Die Ursache für die Erhöhung der Reaktionsausbeuten liegt vermutlich in der besseren Löslichkeit der aliphatischen 3-Hydroxyaldehyde in Gegenwart von DMSO, wodurch eine de facto höhere Substratkonzentration in der Stammlösung enthalten ist, was höhere Initialgeschwindigkeiten und damit höhere Ausbeuten zur Folge hat.

Gerade bei den bi- und trizyklischen Substraten war es a priori nicht vorhersehbar, ob diese von der FSA^{wt} akzeptiert würden. Bemerkenswerterweise wurden tatsächlich Substrate mit bis zu trizyklischen Gerüsten umgesetzt. Zudem konnte das Enzym problemlos beide D-Isomannitol-Derivate **103** und **104** umsetzen, weshalb die Vermutung besteht, dass eine Enantiomerenpräferenz vorliegen könnte. Das Kohlenstoffanalogon (\pm)-**111** zum D-Isomannitol wurde ursprünglich als racemisches Gemisch eingesetzt, wobei nur ein einziges Produkt isoliert werden konnte. In Anbetracht der Tatsache, dass das D-Isomannitol-Derivat abreagiert hatte, wurde vermutet, dass die FSA^{wt} nur das (S,S)-Isomer umgesetzt hatte. Analog wurde angenommen, dass beim trizyklischen Aldehyd (\pm)-**134** nur das (R)-Enantiomer abreagiert, da hier ebenfalls nur ein einzelnes neues Produkt detektiert wurde. Eine Möglichkeit zur Prüfung der Enantiomerenpräferenz läge in der Synthese eines entsprechenden

3-Hydroxyaldehyds ausgehend von L-Isomannitol. Würde dieses von der FSA umgesetzt, so müsste man die Produkte stereoselektiv aufbauen und mittels der üblichen Analysemethoden wie NMR, HPLC und den optischen Drehwert mit den erhaltenen Verbindungen abgleichen. Nachteilig hierbei ist jedoch, dass für die nicht-natürliche Konfiguration erst eine längere Synthese aus teuren Edukten nötig wäre. Für die Beurteilung der prinzipiellen Substratbreite von FSA ist dies jedoch nebensächlich.

Das zweite Ziel, Tandemreaktionen an Dialdehyden mit FSA-Varianten durchzuführen, konnte in Teilen erreicht werden. Die Reaktionen führten sowohl bei den einfachen linearen Dialdehyden wie Glyoxal (**113**),

Glutardialdehyd (**144**) und *threo*-3,4-Dihydroxyhexanedial ((±)-**70**) zu präparativen Ergebnissen. Analog zu den linearen und zyklischen Aldehyden waren die Reaktionen mit DHA und der FSA^{A129S} deutlich langsamer und verliefen teils nur unter Einfachaddition. Einzig bei Glutardialdehyd (**144**) und *threo*-3,4-Dihydroxyhexandial ((±)-**70**) konnte mit der FSA^{wt} und Hydroxyaceton eine Zweifachaddition beobachtet werden. Möglicherweise werden die Substrate nach dem ersten Additionsschritt räumlich zu sperrig und passen nicht mehr in die Enzymtasche, wodurch ein zweiter Additionsschritt verhindert wird. Bei der Reaktion von Glyoxal mit Hydroxyaceton wurde analog zur Reaktion mit Glutardialdehyd erwartet, dass ebenfalls eine Zweifachaddition von Hydroxyaceton stattfinden kann. NMR-spektroskopische Analysen zeigten jedoch, dass hauptsächlich nur die Einfachaddition stattgefunden hatte und sich selbst durch erhöhte Reaktionszeiten keine Verschiebung zur Zweifachaddition erzwingen ließ.

Bei den anderweitig getesteten Dialdehyden war kein Umsatz zu erkennen, mit Ausnahme des D-Isomannitol-basierten Dialdehyds **104**, bei dem nur eine Einfachaddition erzielt werden konnte. Eine Lösung wäre auch hier die Entwicklung von FSA-Varianten, die dem Aldolakzeptor mehr Raum zur Verfügung stellen. Ungeklärt ist, ob die verwendeten Dialdehyde zu einer Inhibition des jeweiligen Enzyms geführt hatten, was ebenso Teil zukünftiger Untersuchungen sein sollte.

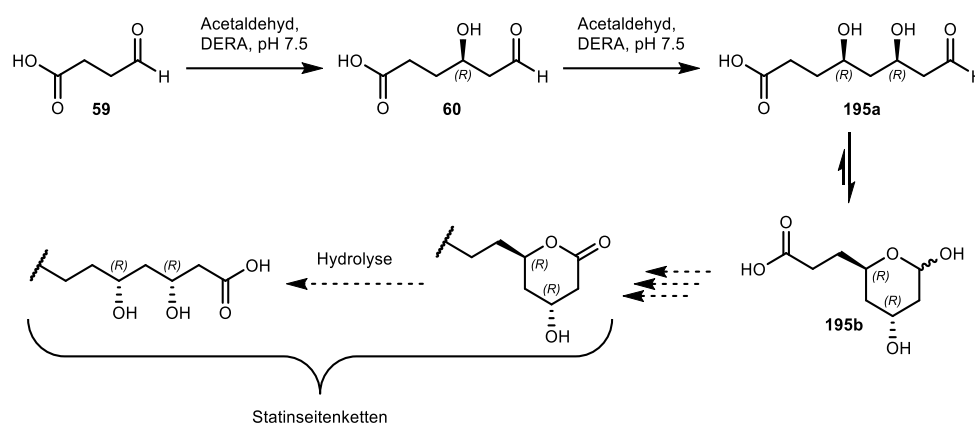
Im Einklang mit den FSA^{wt}- und FSA^{A129S}-katalysierten Reaktionen mit Dialdehyden wurden verschiedene andere Aldolasen getestet, welche bekanntermaßen unpolare Aceton-Derivate als Aldoldonoren umsetzen können. Wie sich zeigte, sind jedoch auch die FSA^{D6H} und die DERA^{F200I} nicht in der Lage, Aceton und dessen Derivate an lineare, unverzweigte Dialdehyde zu addieren. Es bleibt offen, ob die verwendeten Aldolasen durch die Dialdehyde inhibiert werden, oder ob die Aldehyde nicht ausreichend reaktiv für eine Reaktion sind. Der inhibitorische Effekt ließe sich für jedes Substrat und jede Aldolase spezifisch überprüfen. Im Falle einer zu geringen Substrataktivität ließen sich die jeweiligen Aldolasen eventuell modifizieren, um diese einem größeren Substratspektrum zugänglich zu machen. ROLDÁN *et al.* konnten zeigen, dass die FSA^{D6H} durchaus in der Lage ist, Aceton an wenig polare Aldehyde wie 4-Hydroxybutanal^[129] sowie (*R*)- und (*S*)-3-Hydroxybutanal^[129] und an polare Aldehyde wie D-Glycerinaldehyd-3-phosphat^[128] zu addieren. Analog konnte gezeigt werden, dass die DERA^{F200I} erfolgreich Aceton an BSA addieren kann (Kapitel 4.2.1), nicht jedoch an Bernsteinsäuredialdehyd. In letzterem Fall bewirken die Aldehyde eventuell eine Quervernetzung, die zu einer Inaktivierung der DERA führt. Dass die Dialdehyde einen inhibitorischen Effekt auf die FSA ausüben, ließ sich bisher nicht belegen. Es erscheint möglich, dass die Aldehyde aus elektronischen Faktoren keine guten Akzeptorsubstrate für diese Enzyme sind.

Als Fazit lässt sich ziehen, dass der Einsatz des Substratspektrums von der FSA in Bezug auf 3-Hydroxyaldehyde erfolgreich erweitert werden konnte und dass Tandemreaktionen nur mit kleineren, weniger sterisch anspruchsvollen Aldehyden möglich sind. Für den breiteren Einsatz von sterisch anspruchsvolleren 3-Hydroxyaldehyden mit der FSA^{A129S} gilt es noch, mittels gezieltem Protein Engineering entsprechend aktive Katalysatoren maßzuschneidern.

4 Allgemeiner Teil – D-Desoxyribose-5-phosphat-Aldolase

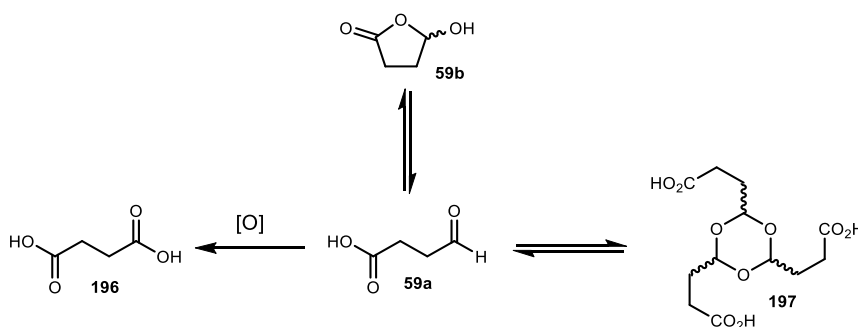
4.1 Synthese von Bernsteinsäuresemialdehyd

Bernsteinsäuresemialdehyd (BSA) wurde als Aldehydbaustein in Erwägung gezogen, um durch enzymatische Aldolreaktionen chirale hydroxylierte C₇- und C₈-Carbonsäuren aufzubauen. Die Idee, BSA als Substrat für DERA-katalysierte Reaktionen zu verwenden, beruht auf der Tatsache, dass dieses dem natürlichen Akzeptorsubstrat D-Glycerinaldehyd-3-phosphat der DERA ähnelt, wobei die Phosphatgruppe durch die Carbonsäuregruppe imitiert wird.^[63] Der Hauptunterschied besteht darin, dass das Grundgerüst des Substrats ein Atom kürzer ist, die Carboxylgruppe im Vergleich zur Phosphatgruppe relativ stabil ist und letztere darüber hinaus an der funktionellen Gruppe praktisch leicht derivatisiert werden kann. Im Vergleich zeigten Reaktionen mit 2-Oxoethylphosphat recht schlechte Ergebnisse,^[61] während BSA von DERA^{Ec} in guten Ausbeuten umgesetzt werden kann.^[63] Da bei der zweifachen Addition von Acetaldehyd zwei neue Stereozentren geschaffen werden, können ausgehend von BSA größere Moleküle aufgebaut werden, wobei sich ein potentieller Nutzen in der Synthese neuer Statine findet (Schema 79), welche diese Lactone oder Carbonsäuren als Seitenkette enthalten.



Schema 79. Umsetzung von BSA mit zwei Anteilen Acetaldehyd unter DERA-Katalyse und mögliche Derivatisierung zu Statinen.

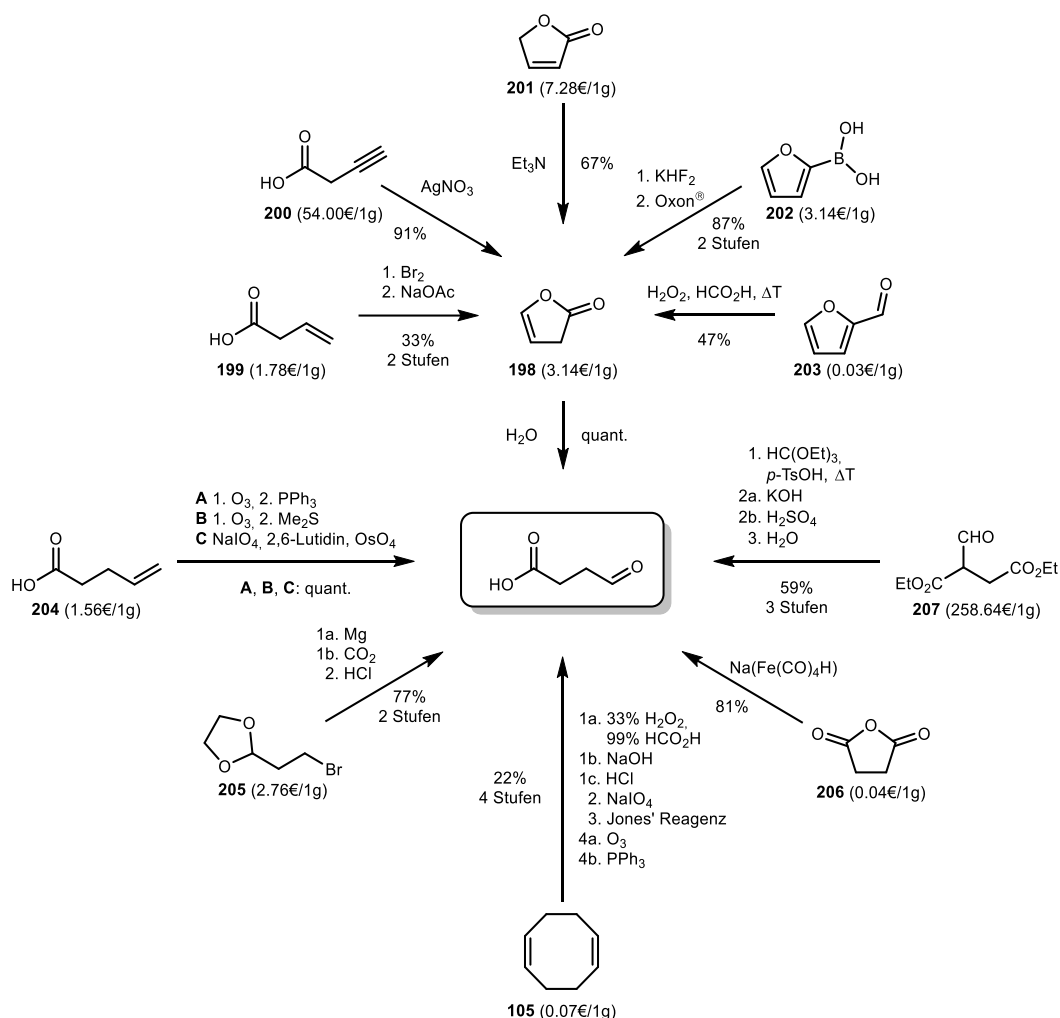
Die Handhabung von BSA als Rohsubstanz stellte sich insofern als schwierig heraus, als dieser durch Luftsauerstoff leicht zu Bernsteinsäure (**196**) oxidiert werden kann (Schema 80). BSA (**59a**) liegt im ständigen Gleichgewicht mit dem zyklischen Halbacetal (**59b**) vor. Bei längerem Stehenlassen trimerisiert BSA zudem zum Trioxolan **197**. Dieses weist prinzipiell die gleichen Reaktionseigenschaften wie BSA auf, besitzt jedoch eine geringere Löslichkeit in Wasser und ist weniger anfällig gegenüber Oxidation durch Sauerstoff.^[173]



Schema 80. Reaktionsmöglichkeiten von BSA (**59**).

Für den Bedarf der anstehenden Reihenversuche mit verschiedenen Nukleophilen wurde nach einer Möglichkeit gesucht, einen lagerungsfähigen Vorläufer zu synthetisieren, da die Autooxidation von BSA zu Ausbeuteverlusten führt und das Trimer durch Destillation im Hochvakuum (Sdp.: 90–92 °C (0.07 mbar)^[174]) vor jedem Einsatz neu aufzureinigen wäre. Der gesuchte Vorläufer sollte nach Möglichkeit in wenigen Syntheseschritten und ohne aufwändige Reinigungsoperationen effizient hergestellt und daraus das BSA unkompliziert freigesetzt werden können.

In der Literatur sind mehrere Methoden zur Synthese von BSA veröffentlicht worden (Schema 81), wovon nachfolgend Beispiele der bis dato vielversprechendsten Synthesen diskutiert werden. Ein Teil der Synthesen geht über Furan-2(3*H*)-on (**198**) als Zwischenstufe. Dieses kann durch saure Hydrolyse nahezu quantitativ in BSA überführt werden.^[175] Je nach Syntheseroute können hier schlechte bis sehr gute Gesamtausbeuten erzielt werden. Die Synthese ausgehend von 3-Butensäure (**199**) verläuft in zwei Stufen mit schlechten Ausbeuten.^[176-177] Ausgehend von 3-Butinsäure (**200**) können mit Silber(I)nitrat sehr gute Ausbeuten erzielt werden,^[177] wobei jedoch das Startmaterial sehr kostspielig ist. Furan-2(5*H*)-on (**201**) kann im Basischen befriedigender Ausbeute zum Furan-2(3*H*)-on (**198**) in umgelagert werden.^[178] Die Synthese ausgehend von Furan-2-ylboronsäure (**202**) verläuft über zwei Stufen in sehr guter Ausbeute,^[179-180] wird jedoch durch die Gesamtkosten der eingesetzten Substrate limitiert. Ausgehend von Furfural (**203**) kann BSA zwar in zwei Stufen hergestellt werden, jedoch liegen die Ausbeuten der Bayer-Villiger-Oxidation bestenfalls im Bereich von 40–50%.^[181] Die C=C-spaltende Synthese von BSA in einem Schritt, ausgehend von 4-Pentensäure (**204**) kann einerseits durch Ozonolyse mit reduktiver Aufarbeitung erfolgen.^[182-183] Hierbei wird Formaldehyd als Nebenprodukt gebildet, welches inhibitorisch auf DERA wirkt, sofern es nicht entfernt wird. Andererseits kann 4-Pentensäure (**204**) durch katalytische Mengen an Osmiumtetroxid dihydroxyliert und anschließend das Diol durch Natriumperiodat zum Aldehyd gespalten werden,^[184] in diesem Fall muss BSA aufgereinigt werden, um die bei der Reaktion anfallenden Salze loszuwerden. Ausgehend von 2-(2-Bromoethyl)-1,3-dioxolan (**205**) kann mittels einer Grignard-Synthese BSA über zwei Stufen in guten Ausbeuten erhalten werden. Das Edukt ist jedoch relativ teuer und Grignard-Additionen an Kohlendioxid sind teilweise aufwändig, was sich in niedrigeren Ausbeuten auszeichnet.^[185] Die Synthese von zwei Äquivalenten BSA durch sequenzielle C=C-Spaltung ausgehend von 1,5-Cyclooctadien (**105**) verläuft über vier Stufen (Kapitel 4.1.2) und hat den Vorteil, dass das Zwischenprodukt (*Z*)-Oct-4-endicarbonsäure stabil und gut lagerbar ist. Jedoch verlaufen die einzelnen Reaktionsschritte mit teils schlechten Ausbeuten^[174] und die Literaturvorschrift verwendet Chromschwefelsäure als bedenkliche Oxidationsmittel. Die Dicarbonsäure kann durch finale Ozonolyse direkt in BSA überführt werden, welche ohne unnötige Aufreinigungsprozesse direkt in Lösung gehandhabt werden kann. Ausgehend von Bernsteinsäureanhydrid (**206**) kann BSA in einer einstufigen Reaktion mittels Na[Fe(CO)₄H] in sehr guten Ausbeuten erhalten werden,^[186] wobei hier der Nachteil in der Synthese des teuren Reduktionsmittels und der zusätzlich nötigen Aufreinigung von BSA besteht. Ausgehend von 2-Formylbernsteinsäurediethylester (**207**) kann BSA in drei Stufen in befriedigenden Ausbeuten synthetisiert werden,^[173] aber auch hier sind die Kosten des Startmaterials nachteilig.



Schema 81. Auswahl an gängigen chemischen Synthesen von BSA (**59**). In Klammer: Preisangabe des jeweiligen Ausgangsmaterials in Euro pro Gramm.¹

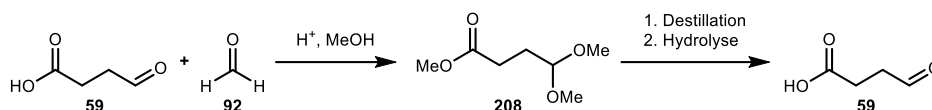
4.1.1 Synthese von BSA ausgehend von 4-Pentensäure

4.1.1.1 Testreaktionen zur Schätzung von BSA

Der einfachste Reaktionsweg zur Herstellung von BSA, geht von 4-Pentensäure (**204**) aus, da hier nur ein Reaktionsschritt notwendig, laut Literatur quantitativer Umsatz erreichbar, und das Edukt mit 1.56 € pro Gramm relativ günstig ist. Die Reaktion hat einzig den Nachteil, dass das als Nebenprodukt gebildete Formaldehyd entfernt werden muss, da dieses DERA inhibiert. Es wäre daher vorteilhaft, die Aldehyd- und die Carbonsäuregruppe mit einer Schutzgruppe zu versehen um die Aufreinigung zu erleichtern und gleichzeitig eine stabile, lagerungsfähige Vorstufe von BSA zu erhalten. Am einfachsten erschien die Umsetzung des Oxidationsproduktes in saurer methanolischer Lösung, da hier im Prinzip kein zusätzlicher Aufreinigungsschritt notwendig wäre und BSA direkt in der rohen Reaktionslösung weiterverwendet werden kann. Als ideales Produkt wurde Methyl-4,4-dimethoxybutanoat (**208**) angesehen (Schema 82), welches durch Destillation von

¹ Stand 19.11.2019. Es wurde jeweils das günstigste Angebot von mehreren Anbietern gewählt.

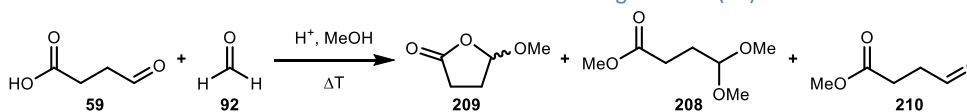
Nebenprodukten (Formaldehyd aus der Ozonolyse) getrennt werden könnte und durch anschließende Hydrolyse wieder in BSA zurückgeführt werden könnte.



Schema 82. Theoretische Umsetzung von BSA (**59**) zu Methyl-4,4-dimethoxybutanoat (**208**) als stabiles Intermediat und anschließende Hydrolyse zum Semialdehyd **59**.

Die Ozonolyse wurde mit 4-Pentensäure (**204**) durchgeführt und die Reaktion durch Zugabe von Dimethylsulfid abgebrochen, wobei BSA (**59**) und Formaldehyd (**92**) gebildet wurden. Um herauszufinden, unter welchen Reaktionsbedingungen ein vollständiger Umsatz von BSA stattfindet und welche Produkte bei der Reaktion mit Methanol gebildet werden, wurde als Katalysatoren *para*-Toluolsulfonsäure (pTsOH) sowohl in wasserfreier Form, als auch in essigsaurer Lösung ausprobiert. Bei beiden Reaktionsbedingungen wurden verschiedene Konzentrationen und Reaktionstemperaturen getestet, sowie der Einfluss von Molekularsieb (3Å) und/oder Orthoameisensäuretrimethylester überprüft. Die Parameter und Ergebnisse der Testreaktionen sind in Tabelle 25 zusammengefasst. Je 1 mL der Reaktionslösung aus der Ozonolyse (enthält 0.63 mmol BSA) wurde unter Zugabe der jeweiligen Menge an Reagenzien nach 20 min, 1 h und 2 h dünnschichtchromatographisch untersucht. Nach zwei Stunden wurde ein GC-Proben entnommen. Zur Beurteilung der Reaktionseffizienz wurde auf den Verbrauch des Startsubstrats, die Bildung neuer Signale und deren Anzahl geachtet.

Tabelle 25. Testreaktionen zur Schützung von BSA (**59**).



#	Katalysator	Menge Kat. [eq]	(MeO) ₃ CH [eq]	Molekularsieb ^a (3Å)	ΔT [°C]	GC-Signale
1		0.05	1.1	–	25	2
2		0.10	1.1	–	25	2
3 ^b		0.05	0	–	25	2
4 ^b		0.10	0	–	25	2
5		0.05	1.1	+	25	5
6		0.10	1.1	+	25	5
7		0.05	0	+	25	5
8	pTsOH (12% in	0.10	0	+	25	5
9	AcOH)	0.05	1.1	–	50	2
10		0.10	1.1	–	50	2
11		0.05	0	–	50	2
12		0.10	0	–	50	2
13		0.05	1.1	+	50	5
14		0.10	1.1	+	50	5
15		0.05	0	+	50	5
16		0.10	0	+	50	5

Tabelle 25. (fortgesetzt)

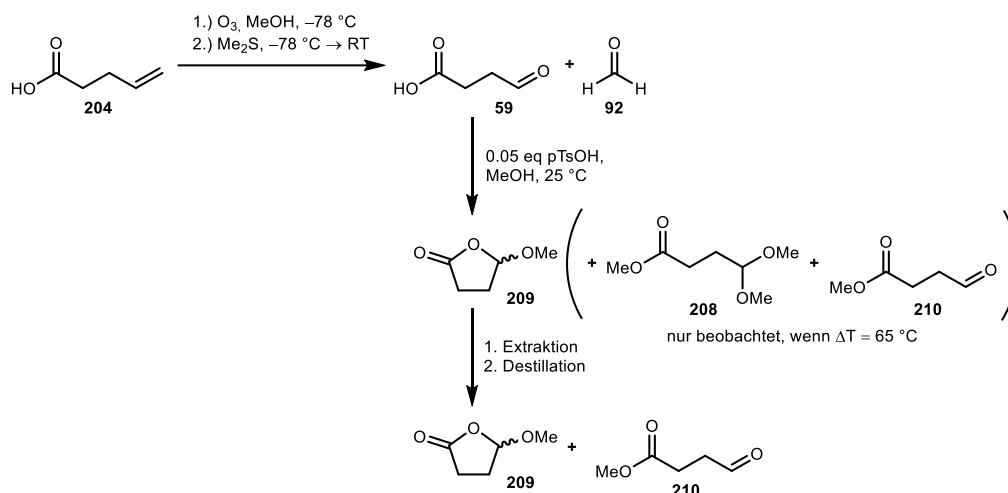
17		0.05	1.1	–	25	2
18		0.10	1.1	–	25	2
19 ^b		0.05	0	–	25	2
20 ^b		0.10	0	–	25	2
21		0.05	1.1	+	25	5
22		0.10	1.1	+	25	5
23		0.05	0	+	25	5
24	pTsOH	0.10	0	+	25	5
25		0.05	1.1	–	50	2
26		0.10	1.1	–	50	2
27		0.05	0	–	50	2
28		0.10	0	–	50	2
29		0.05	1.1	+	50	5
30		0.10	1.1	+	50	5
31		0.05	0	+	50	5
32		0.10	0	+	50	5

^a+: mit Molekularsieb; –: ohne Molekularsieb; ^bals vielversprechend befundene Reaktionsbedingungen.

Bei Reduktion der Ozonide durch Zugabe von Dimethylsulfid wird zusätzlich DMSO gebildet, welches in der GC eine Retentionszeit von $t_{R,DMSO} \approx 9.3$ min aufweist. Bei allen Testreaktionen, bei denen Molekularsieb zugegeben wurde, waren Signale bei $t_R = 9.3$ min [DMSO], 10.2 min [209], 10.5 min [208], 10.7 min und 12.3 min [BSA] in den GC-Analysen zu erkennen. Bei $t_R = 10.2$ min wurde das stärkste Signal beobachtet, da jedoch die Bildung von Nebenprodukten (Signale bei $t_R = 10.5$ min und 10.7 min) in zu großen Mengen auftrat, wurden Reaktionen mit Molekularsieb für größere Ansätze nicht in Betracht gezogen. Bei den Testreaktionen ohne Molekularsieb wurde hingegen einheitlich die Ausbildung eines neuen Produktsignals bei $t_R = 10.2$ min beobachtet, während andere Signale vermindert oder gar nicht auftraten. Die Reaktionen mit bzw. ohne Molekularsieb verliefen jeweils unter ähnlich gutem Umsatz. Die Testansätze pTsOH unter beiden Reaktionsbedingungen wiesen nahezu identisches Verhalten auf. Die GC-Daten legten nahe, dass eine vollständige Umwandlung von BSA bereits bei Raumtemperatur erreicht werden kann (Eintrag 3, 4, 19 und 20), ohne dass weitere Zusätze wie Orthoameisensäuremethylester oder Molekularsieb notwendig sind. Die Ergebnisse der Testreaktionen zeigen, dass die Zugabe von pTsOH ohne weitere Zusätze ausreicht, um BSA bei 25 °C umzusetzen. Infolgedessen wurden die Schützungsreaktionen im präparativen Maßstab unter diesen Reaktionsbedingungen durchgeführt.

4.1.1.2 Schützung von BSA im präparativen Maßstab

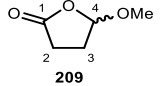
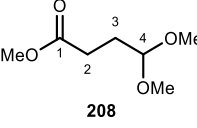
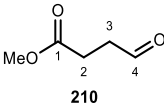
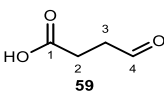
Für die Schützung von BSA im präparativen Maßstab wurden zwei Ozonolyseansätze in Methanol durchgeführt und die Reaktionslösungen nach Abbruch der Reaktion einmal mit pTsOH·H₂O sowie einmal mit pTsOH in Lösung (12 Gew.-% in AcOH) bei Raumtemperatur umgesetzt (Schema 83.).



Schema 83. Ozonolyse von 4-Pentensäure (**204**) und anschließende Derivatisierung mit 0.05 eq pTsOH und Methanol.

Nach Ende der Reaktion wurde ein Teil der Reaktionslösung mittels NMR untersucht, nachdem als Hauptprodukt das zyklische Acetal (**209**) und nicht, wie erwartet, der Acetalester **208** (Schema 82) gebildet wurde. Wenn die Reaktion unter Rückfluss durchgeführt wurde, waren zusätzlich der Acetalester **208** und der Aldehyd **210** nachweisbar. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und die wässrige Lösung jeweils mit Diethylether und Essigsäureethylester extrahiert, um die Reaktionsprodukte von DMSO zu trennen. Die Analyse der organischen Phasen mittels Dünnschichtchromatographie zeigte jedoch, dass keines der gewählten Extraktionsmittel in der Lage war, das Produkt in ausreichender Reinheit von DMSO zu befreien. Im Anschluss wurden die vereinigten, organischen Phasen nach Entfernen des Lösungsmittels destilliert und die gesammelten Fraktionen mittels NMR und GC analysiert (Tabelle 26).

Tabelle 26. Analytik der gefundenen Reaktionsprodukte aus der Schützung von BSA (**59**) mit Methanol und der anschließenden Hydrolyse.

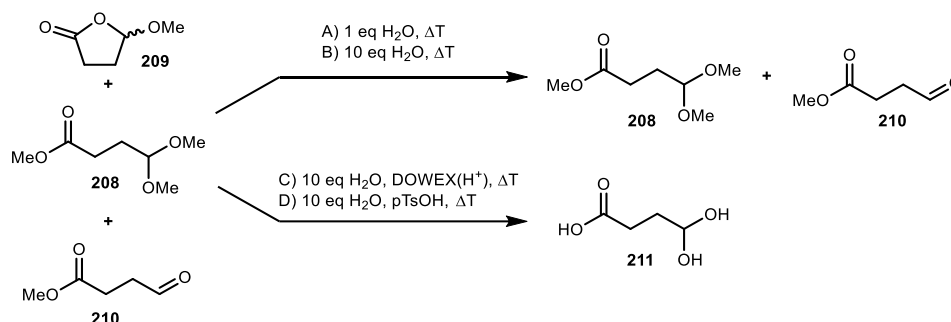
Produkt	GC t _R [min]	¹ H-NMR ^a [ppm]	¹³ C-NMR ^b [ppm]	HPLC ^c t _R [min]
	10.2	4.58 (t, <i>J</i> = 5.5 Hz, 1H, <i>H</i> -4), 3.43 (s, 3H, OCH ₃), 2.47 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H, <i>H</i> -2), 1.95 (dt, <i>J</i> = 7.4, 5.5 Hz, 2H, <i>H</i> -3)	175.6 (C-1), 104.3 (C-4), 53.7 (OCH ₃), 28.9 (C-2), 27.6 (C-3)	n.b. ^d
	10.5	5.11 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H, <i>H</i> -4), 3.76 (s, 6H, 2x OCH ₃), 3.43 (s, 3H, CO ₂ CH ₃), 2.56 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H, <i>H</i> -2), 1.99 (dt, <i>J</i> = 7.5, 5.6 Hz, 2H, <i>H</i> -3)	176.5 (C-1), 90.1 (C-4), 55.2 (CO ₂ CH ₃), 53.7 (2x OCH ₃), 32.3 (C-3), 29.3 (C-2)	n.b. ^d
	8.8	9.76 (t, <i>J</i> = 0.5 Hz, 1H, <i>H</i> -4), 3.76 (s, 3H, CO ₂ CH ₃), 2.94 (dt, <i>J</i> = 6.5, 0.5 Hz, 2H, <i>H</i> -3), 2.74 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H, <i>H</i> -2)	205.7 (C-4), 176.3 (C-1), 52.4 (CO ₂ CH ₃), 38.1 (C-3), 26.3 (C-2)	16.1
	n.b. ^c	Als Hydrat: 5.08 (t, <i>J</i> = 5.6 Hz, 1H, <i>H</i> -4), 2.48 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H, <i>H</i> -2), 1.90 (dt, <i>J</i> = 7.5, 5.6 Hz, 2H, <i>H</i> -3)	Als Hydrat: 177.8 (C-1), 90.0 (C-4), 32.2 (C-3), 29.2 (C-2)	15.8

^a300.1 MHz, D₂O; ^b75.5 MHz, D₂O; ^cDerivatisierung mittels *O*-Benzylhydroxylamin; ^dnicht bestimmt.

Die NMR-spektroskopische Untersuchung zeigte, dass das zyklische Acetal (**209**) und der Acetalester (**208**) abgetrennt worden waren. Da vor der Destillation nur das zyklische Acetal **209** gebildet wurde, muss entweder beim Extraktionsschritt oder bei der Destillation die Ringöffnung zum Aldehyd **210** erfolgt sein, wobei Letzteres wahrscheinlicher erscheint. Der Aldehyd **210** weist in den Gaschromatogrammen eine Retentionszeit von $t_R = 8.8$ min auf, die bei den Testreaktionen vorher nicht beobachtet wurde, was die Hypothese unterstützt, dass dieser erst während der Destillation gebildet wurde. Dünnschichtchromatographisch ließen sich die Produkte hingegen nicht voneinander unterscheiden. Da die Siedepunkte der Reaktionsprodukte relativ nah beieinander liegen [Acetalester **208**: 86–88 °C (20 mbar)^[187]; zyklisches Acetal **209**: 88–89 °C (20 mbar)^[188]; Aldehyd **210**: 76–78 °C (20 mbar)^[174]] konnten diese destillativ nicht ausreichend voneinander getrennt werden. Wie erwartet konnte Formaldehyd durch Destillation entfernt werden, die erhaltenen analytischen Daten zeigten jedoch, dass sowohl der Acetalester **208** als auch das zyklische Acetal **209** jeweils nicht als Reinsubstanz erhalten werden konnten. Letzteres sollte analog zum Acetalester **208** unter normalen Bedingungen stabil und lagerungsfähig sein. Ungünstig war, dass die selektive Synthese des zyklischen Acetals **209** nicht reproduzierbar war, da bei Folgeversuchen immer nur ein Gemisch aller drei Intermediate erhalten wurde.

4.1.1.3 Hydrolyse zu BSA

Obwohl sich das Gemisch aus Acetalester **208**, zyklischem Acetal **209** und Aldehyd **210** destillativ sowie per Säulenchromatographie nicht auftrennen ließ, wurde versucht, durch Hydrolyse alle drei Substanzen gemeinsam in BSA zu überführen. Für die Hydrolyse wurden verschiedene Reaktionsbedingungen getestet (Schema 84). Es sollte überprüft werden, ob die Hydrolyse ohne Zusatz eines sauren Katalysators mit einem oder zehn Äquivalenten Wasser durchführbar ist. Im Anschluss wurde getestet, ob sich pTsOH und DOWEX(H⁺) als saure Katalysatoren eignen.



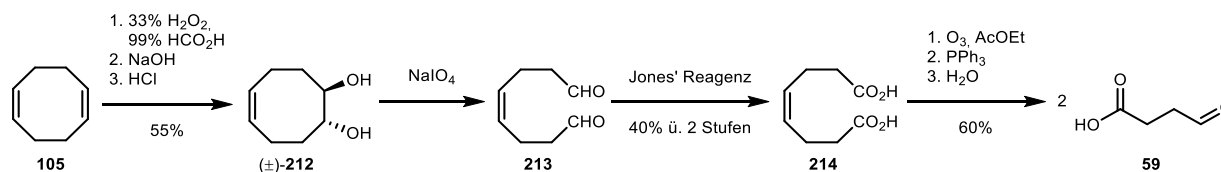
Schema 84. Tests zur Hydrolyse des Reaktionsgemisches des zyklischen Acetals **209**, Acetalesters **208** und Aldehyds **210**.

Wenn das Gemisch mit einem oder zehn Äquivalenten Wasser unter Rückfluss erhitzt wurde, so nahm nur der Anteil des zyklischen Acetals **209** ab, aber die Bildung von BSA (als Hydrat, **211**) wurde nicht beobachtet. Bei zehn Äquivalenten Wasser mit DOWEX(H⁺) oder pTsOH als sauren Katalysator wurde ein Umsatz der Startmaterialien beobachtet. Mit DOWEX(H⁺) konnte ein nahezu vollständiger Umsatz des Substanzgemisches beobachtet werden, während bei der Reaktion mit pTsOH die Reaktion unvollständig verlief. Nach Ausweis der NMR-, GC- und HPLC-Daten wurde, dass in beiden Fällen BSA als Hydrat **211** gebildet. Die Hydrolyse der gebildeten Intermediate stellt sich somit als wenig problematisch heraus, sofern DOWEX(H⁺) als Katalysator verwendet wird, da unter diesen Reaktionsbedingungen die Intermediate fast einheitlich in BSA überführt werden konnten.

Allgemein stellt sich die Syntheseroute ausgehend von 4-Pentensäure jedoch als unhandlich heraus. Bei einer der Schützungsreaktionen konnte zwar selektiv 5-Methoxydihydrofuran-2(3*H*)-on (**209**) hergestellt werden, die Reaktion ließ sich jedoch nicht zuverlässig reproduzieren. Gegen den vorgeschlagenen Reaktionsweg spricht insbesondere, dass unter den Reaktionsbedingungen kein einheitliches Produkt gebildet wird und der als Intermediat gebildete, oxidationslabile Aldehyd **210** nicht längerfristig lagerungsfähig ist. Für die Hydrolyse ist es zudem stets notwendig, die Konzentration aller Zwischenprodukte mittels NMR zu bestimmen, was in der Praxis zwar einfach durchzuführen ist, aber dennoch einen unnötigen Mehraufwand bedeutet. Weiterhin ließ sich das gebildete DMSO nicht von den gebildeten Produkten abtrennen, was jedoch nicht problematisch ist, da dieses in den geplanten Folgereaktionen mit Enzymkatalysatoren bis zu einem Volumenanteil von 20% nicht gravierend stört.

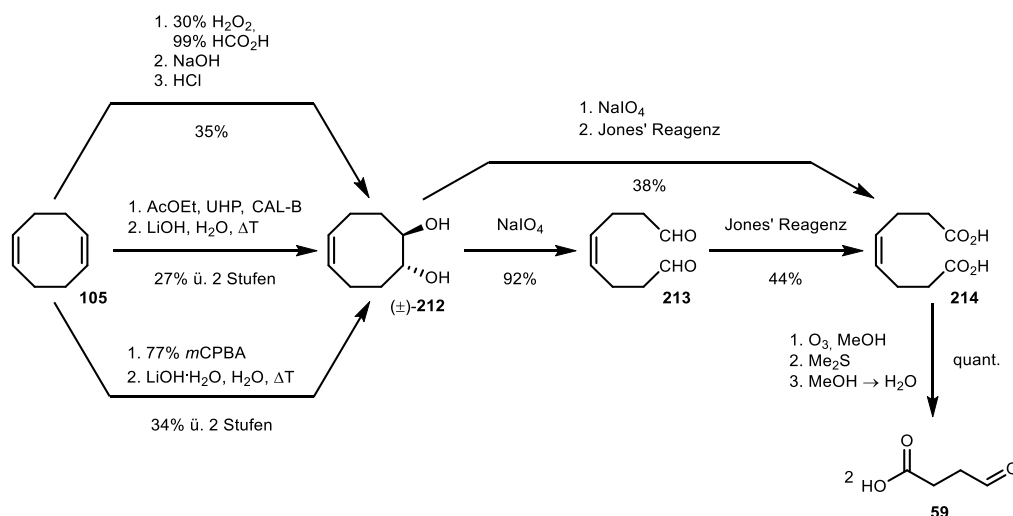
4.1.2 Synthese von BSA ausgehend von 1,5-Cyclooctadien

Furfural (**203**), 1,5-Cyclooctadien (**105**) und Bernsteinsäureanhydrid (**206**) kosten in etwa zwischen 30 bis 70 € pro Kilogramm Material, sodass diese unter wirtschaftlichen Aspekten eine sinnvolle Grundlage für eine Synthese im Großmaßstab bieten. Die Synthese ausgehend von Bernsteinsäureanhydrid (**206**) findet zwar in einer Stufe statt, wird aber durch Einsatz des speziellen Reduktionsmittels Na[Fe(CO)₄H] unnötig teuer, weshalb diese nicht näher in Erwägung gezogen wurde. Die zweistufige Reaktion aus Furfural (**203**) findet im ersten Schritt mit nur geringen Ausbeuten statt, sodass diese Syntheseroute ebenfalls zunächst verworfen wurde. Letztlich wurde die Synthese von (*Z*)-Oct-4-endicarbonsäure (**214**) aus 1,5-Cyclooctadien (**105**) als stabilem Vorläufer für BSA (**59**) in Erwägung gezogen.^[174] MANZOCCHI *et al.* synthetisierten die Dicarbonsäure **214** über drei Stufen in 22% Ausbeute und spalteten das Alken durch Ozonolyse in BSA (Schema 85), welches durch Destillation mit einer Ausbeute von 60% erhalten wurde. Wenn BSA jedoch ohne Isolierung direkt in wässriger Lösung gehandhabt wird, dann sollten möglicherweise höhere Ausbeute erreichbar sein.



Schema 85. Literatursynthese von BSA (**59**) ausgehend von 1,5-Cyclooctadien (**105**) und anschließende Ozonolyse.^[174,189]

Die Syntheseroute wurde entsprechend der Literatur reproduziert (Schema 86). Ein Versuch der Dihydroxylierung nach YATES *et al.* gelang in 35% Ausbeute. Die niedrigere Ausbeute lässt sich dadurch erklären, dass abweichend von der Literatur versucht wurden das Diol (\pm)-**212** säulenchromatographisch aufzureinigen. Die Aufreinigung per Destillation erscheint retrospektiv ergiebiger zu sein, obwohl die Säulenchromatographie ein schonenderes Aufreinigungsverfahren ist. Problematisch ist jedoch, dass das säulenchromatographische Aufreinigen von Reaktionen im großen Maßstab nicht rentabel ist. Die Ausbeute des Dihydroxylierungsschritts erschien mit 35% Ausbeute als nicht effizient genug, sodass alternative Synthesemöglichkeiten in Erwägung gezogen wurden.



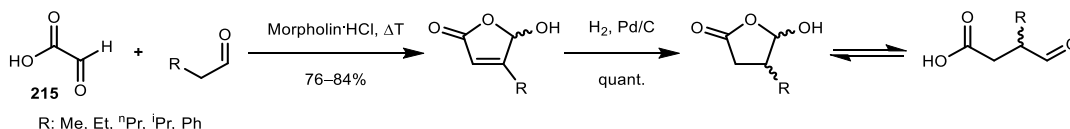
Schema 86. Unterschiedliche Syntheserouten zur Herstellung von (Z)-Oct-4-enedicarbonsäure (**214**) und anschließende Ozonolyse.

Da die Reaktion über ein Epoxid verläuft, wurden zwei alternative Wege zur Herstellung des Epoxids getestet. Zum einen wurde 1,5-Cyclooctadien (**105**) durch Perhydrolyse (Bildung von Peressigsäure) mittels Harnstoff-Wasserstoffperoxid, Ethylacetat und *Candida antarctica* Lipase B in das Mono-Epoxid überführt. Die Öffnung erfolgte mittels Lithiumhydroxid im Wässrigen, wobei eine Gesamtausbeute von 27% über 2 Stufen erzielt wurde. Zum anderen wurde eine Epoxidierung mittels *m*-Chlorperbenzoesäure und anschließender Ringöffnung mit Lithiumhydroxid durchgeführt, wobei die Zielverbindung in 34% Ausbeute erhalten wurde. Die Spaltung des Diols (\pm)-**212** gelang mit Natriumperodat in 94% Ausbeute und die Oxidation zur Disäure **214** in 44% Ausbeute, was einer Gesamtausbeute von 40% über 2 Stufen entspricht. Wurde der rohe Dialdehyd **213** nach der Herstellung direkt oxidiert, wurde eine etwas niedrigere Ausbeute von 38% über 2 Stufen erhalten. Durch Ozonolyse in Methanol und Wechsel des Lösungsmittels nach der Reaktion auf Wasser konnte eine Stammlösung von BSA hergestellt werden, ohne dass dieser isoliert werden musste.

Die Herstellung des Diols und die Oxidation des Dialdehyds waren offenbar die ineffizientesten Schritte in dieser Synthese. Der erste Schritt ließe sich zwar analog zur Literatur durch eine Destillation verbessern, hat aber dennoch den Nachteil, dass die Gesamtausbeute bestenfalls befriedigend ist. Der dritte Reaktionsschritt ist akzeptabel, da dieser mittels Chromschwefelsäure erfolgt und es erstrebenswert ist, Chrom(VI)-verbindungen als Reagenzien gänzlich zu vermeiden.

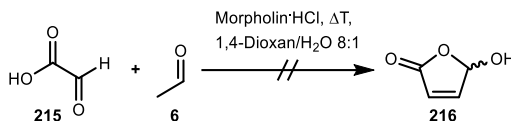
4.1.3 Synthese von BSA über 5-Hydroxyfuran-2(5H)-on

Eine weitere Überlegung zur Synthese von BSA war, nach einem stabilen Dihydrofuranonvorläufer zu suchen. BOURGUIGNON *et al.* berichteten über die Synthese von 3-substituierten Bernsteinsäuresemialdehyden durch Kondensation von Glyoxylsäure (**215**) mit verschiedenen aliphatischen Aldehyden über γ -Hydroxybutenolide (Schema 87).^[190] Die Methode war jedoch noch nicht auf Acetaldehyd für die Herstellung der unsubstituierten Stammverbindungen angewandt worden.



Schema 87. Synthese 3-substituierter Bernsteinsäuresemialdehyde.^[190]

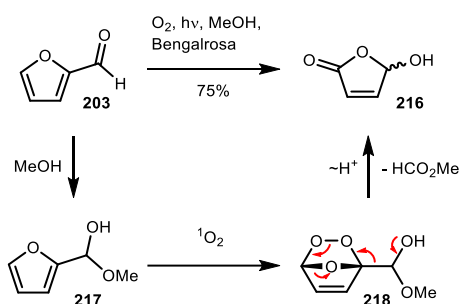
Daher wurde versucht die gleichen Reaktionsbedingungen auf die Synthese von BSA über das Furanon **216** zu übertragen (Schema 88).



Schema 88. Versuche zur Synthese von 5-Hydroxyfuran-2(5H)-on (**216**).

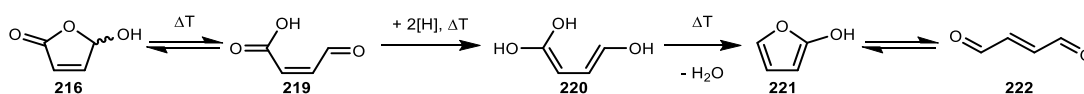
Glyoxylsäure (50% v/v, **215**) wurde mit äquimolaren Mengen Acetaldehyd (**6**) unter Katalyse mit Morpholinhydrochlorid umgesetzt. NMR-spektroskopisch konnte keine Produktbildung festgestellt werden. Auch ein zweiter Versuch mit Glyoxylsäure-Monohydrat wies keine Produktbildung auf. Um auszuschließen, dass die Reaktion wegen einer zu geringen Konzentration an dem flüchtigen Acetaldehyd (**6**) scheiterte, wurde ein dritter Versuch mit drei Äquivalenten Acetaldehyd durchgeführt, bei welchem ebenfalls kein Produkt nachweisbar war.

Als weitere Alternative wurde daher die Photooxidation von Furfural nach MORADEI *et al.* erprobt.^[191] Dieser Syntheseweg besitzt den Vorteil, dass Literatúrausbeuten von 81–85% erzielt werden können und der anschließende Hydrierungsschritt nahezu quantitativ verläuft. Bengalrosa wird zwar nur in katalytischen Mengen eingesetzt, wird aber unter den Reaktionsbedingungen der Photooxidation durch Photobleichen verbraucht. Durch diese Reaktion konnte das Furanon **216** auf Anhieb in 75% Ausbeute (95% Reinheit) isoliert werden (Schema 89).



Schema 89. Photooxidation von Furfural (**203**).

Da sich bei der Aufreinigung zeigte, dass das Furanon **216** laut NMR jedoch nur in 95% Reinheit erhalten werden konnte, wurden zusätzliche Anstrengungen unternommen, um dessen Reinheit zu erhöhen. Weder ein Wechsel von Chloroform auf CH/EE 1:1 für die Umkristallisation noch eine säulenchromatographische Aufreinigung bewirkte eine Verbesserung der Reinheit. Der Versuch, 5-Hydroxyfuran-2(5H)-on (**216**) per Kugelrohrdestillation (170 °C, 1.2 mbar) aufzureinigen, bewirkte überraschend die Bildung von 2-Furanol (**221**) und Fumaraldehyd (**222**) (Schema 90).



Schema 90. Vermutete Bildung von 2-Furanol (**221**) und Fumaraldehyd (**222**) aus 5-Hydroxyfuran-2(5H)-on (**216**) bei erhöhten Temperaturen.

Da dies nur durch einen reduktiven Prozess geschehen sein konnte, musste während der Reaktion eine intermolekulare Redoxreaktion stattgefunden haben, wobei die oxidierte Spezies nicht isoliert und daher nicht

identifiziert wurde. Möglich wäre die Bildung von Fumarsäure, welche unter Normaldruck bei 200 °C sublimiert und daher hypothetisch hätte beobachtet werden können. Eine NMR-spektroskopische Untersuchung der isolierten Fraktionen aus der Destillation bestätigt die Bildung von 2-Furanol (**221**) und Fumaraldehyd (**222**) (Abbildung 33).

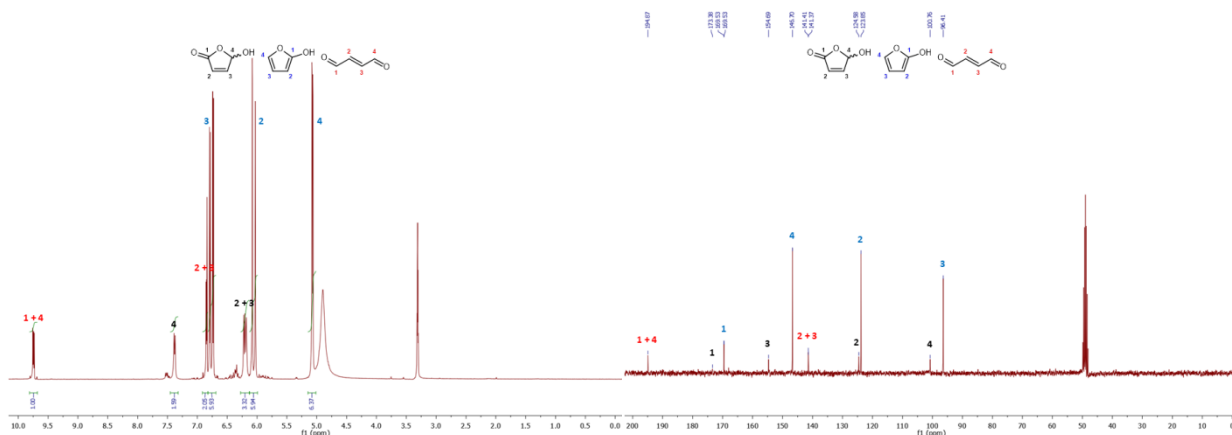
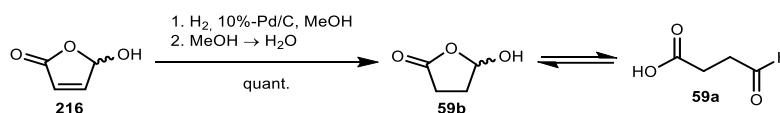


Abbildung 33. ¹H- und ¹³C-NMR (300.1 MHz, Methanol-d₄) von 5-Hydroxyfuran-2(5H)-on (**216**) nach Kugelrohrdestillation.

YOSHIMITSU *et al.* berichteten über die Hydrierung des Furanons **216** mit Wasserstoff über Palladium in Ethylacetat. Obwohl das Furanon **216** in organischen Lösungsmitteln stabil sein sollte, wäre bei einer Isolierung mit Ausbeutenverlusten zu rechnen, sodass die Hydrierung stattdessen direkt in Methanol bis zu vollständigem Umsatz durchgeführt wurde (Schema 91). Durch Lösungsmittelaustausch wurde BSA (**59**) danach in wässrige Lösung überführt, womit eine Ausbeute von 75% Ausbeute über zwei Stufen erzielt werden konnte.



Schema 91. Hydrierung von 5-Hydroxyfuran-2(5H)-on (**216**).

Die oben dargestellte Synthese stellt die bis dato effizienteste und kostengünstigste Syntheseroute dar, deren Vorteil insbesondere darin liegt, dass Furfural als preiswerte Bulk-Chemikalie² eingesetzt wird, welche relativ effizient aus erneuerbaren Ressourcen gewonnen werden kann. Zudem werden keine großen Mengen an schädlichen Chemikalien verwendet, da hier nur Sauerstoff und Wasserstoff als Reagenzien stöchiometrisch eingesetzt werden und sich die Aufreinigung auf Umkristallisation beschränkt. Bengalrosa und Palladium werden nur in katalytischen Mengen zugesetzt, wobei Ersteres zwar zum Photobleichen neigt und nicht wiederverwendet werden kann, Letzteres hingegen wieder genutzt oder aufbereitet werden kann. Unnötige Abfälle werden vermieden, da sich im ersten Reaktionsschritt nur Ameisensäuremethylester als Nebenprodukt bildet (Schema 89). Kommerzielle Anfragen³ bei mehreren Anbietern zu Angeboten von BSA (27300 € pro 1 kg, DSK Biopharma, Inc.) oder Vorläufern wie Methyl-4-oxobutanoat (5415 € pro 1 kg, Finetech Industry Ltd.) oder 5-Ethoxydihydrofuran-2(3H)-on (9220 € pro 1 kg, Akos Consulting & Solutions GmbH) zeigten auf, dass Mengen von 1 kg bereits sehr teuer sind, sodass sich der oben gezeigte Weg als sinnvolle Alternative darstellt.

²~32 € pro 1 kg, VWR, Zugriff 18.10.2019

³ Kostenanfragen von Mai 2015.

4.2 Synthese chiraler hydroxylierter C₇-Carbonsäuren

Ein Vorteil von unpolaren Aldoldonoren liegt darin, dass diese meist leicht verfügbar sind bzw. sich industriell einfach herstellen lassen. Um universelle enzymatische Katalysatoren zur Umsetzung unpolarer Aldoldonoren zu finden, müssen diese dementsprechend auf eine breitere Anzahl an Substraten untersucht werden. BSA sollte im Rahmen dieser Arbeit mit einer Reihe an Acetonderivaten auf Aktivität verschiedener DERA- und FSA-Varianten getestet werden. Hydroxy- und Dihydroxyaceton sollten als hydroxylierte Substrate getestet werden, während Aceton, Fluoraceton und 1,3-Difluoraceton als aliphatische, unpolare Modellssubstrate Verwendung fanden. Basierend auf unveröffentlichten Enzymscreenings aus dem Arbeitskreis FESSNER⁴ wurde PRO-ALD(062) als geeigneter Katalysator für Acetonderivate ausgewählt.⁵ Die von JENNEWEIN *et al.* entwickelte DERA^{Ec}-Variante DERA^{F200I} konnte zusätzlich getestet werden.^[134] Bei den Donoren Hydroxyaceton und Dihydroxyaceton wurde FSA^{wt} bzw. FSA^{A129S} eingesetzt. Als weitere FSA-basierte Aldolase wurde FSA^{D6H} getestet, welche in der Lage ist, Aceton als Donor zu verwenden. Allgemein hat bei FSA die Aminosäure D6 neben der Koordination des Hydroxyketons einen Einfluss auf die Abstraktion des Protons in α -Position des Aldoldonors. Die Änderung von Asparaginsäure zu Histidin erlaubt folglich den Einsatz wenig polarer Aldoldonoren wie Aceton.^[128] Durch Umsetzen von BSA mit diversen Acetonderivaten sollten sich auf diesem Weg hydroxylierte C₇-Carbonsäuren herstellen lassen.

Das Reaktionsscreening wurde im Volumen von 500 μ L mit einer BSA-Konzentration von 50 mM als Akzeptorsubstrat und, sofern nicht anders vermerkt, mit einer Donorkonzentration von 150 mM durchgeführt. Die Reaktionen wurden mit Triethanolamin (TEA) bei pH 7.5 gepuffert und fanden bei 25 °C statt. Alle Reaktionen wurden zur Kontrolle zusätzlich ohne Zugabe von Enzym getestet, um einen nicht-enzymatischen Syntheseweg ausschließen zu können. Nach 0.5, 1, 2, 4, 6 und 24 Stunden wurden HPLC-Proben vermessen. Nach 24 Stunden wurden die Reaktionen zudem mittels DC kontrolliert. Produktbildung wurde qualitativ an neu gebildeten Flecken auf der DC bzw. anhand neu gebildeter Signale in der HPLC ausgemacht. Tabelle 27 fasst die Ergebnisse des Screenings zusammen.

⁴ Anna Szekrényi, Technische Universität Darmstadt (Deutschland), unveröffentlicht. Zwei DERA-Varianten, PRO-ALD(024) und PRO-ALD(062), wurden gefunden. PRO-ALD(024) besitzt eine Sequenz-Identität von 33% und eine Ähnlichkeit von 50% im Vergleich zu DERA^{Ec} und weist eine erhöhte Affinität gegenüber BSA auf, während PRO-ALD(062) eine Sequenz-Identität von 30% und eine Ähnlichkeit von 50% zu DERA^{Ec} aufweist und dafür eine höhere Affinität gegenüber unpolaren Aldoldonoren zeigt. Die Sequenz-Identität von PRO-ALD(024) und PRO-ALD(062) beträgt 59% mit einer Ähnlichkeit von 77%.

⁵ PRO-ALD(024) und PRO-ALD(062) zur Verfügung gestellt von *Prozomix Ltd* (Haltwhistle, UK).

Tabelle 27. DERA*- und FSA*-katalysierte Testreaktionen von Acetonderivaten an Bernsteinsäuresemialdehyd.

R	R'	Katalysator	Produktanalytik	
			DC ^a	HPLC ^b
H	H	DERA ^{F200I}	+ ^c	+ ^c
H	H	PRO-ALD(062)	+ ^c	+ ^c
H	H	FSA ^{D6H}	– ^c	– ^c
OH	H	FSA ^{wt}	–	–
OH	OH	FSA ^{A129S}	–	–
F	H	DERA ^{F200I}	+	+
F	H	PRO-ALD(062)	+	+
F	F	DERA ^{F200I}	–	–
F	F	PRO-ALD(062)	–	–

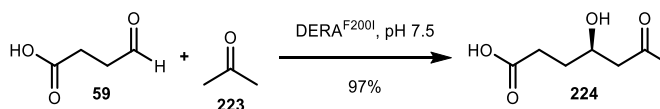
Die Reaktionen wurden in 500 µL Gesamtvolumen mit 150 mM Donor, 50 mM Akzeptor, 25 mM TEA-Puffer, pH 7.5, 25 °C und 1.5 mg Enzym durchgeführt; +: Neuer Fleck (DC) oder neues Signal (HPLC); –: Keine Veränderung; ^aAnfärbung mit Anisaldehydreagenz.

^bKontrolle nach 0.5, 1, 2, 4, 6 und 24 h; ^czusätzlich mit 500 mM Akzeptor getestet.

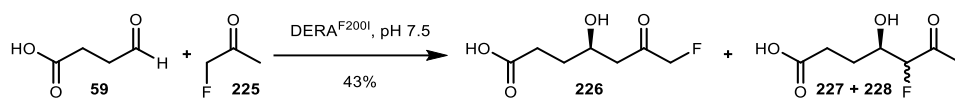
Bei den getesteten Acetonderivaten wurde nur bei Aceton (R = H, R' = H) und Fluoraceton (R = F, R' = H) ein Umsatz beobachtet. HPLC-Untersuchungen wiesen auf eine Aktivität mit Aceton bei DERA^{F200I} und PRO-ALD(062) hin. Es war zu erkennen, dass die Reaktion mit DERA^{F200I} sowohl mit 3 als auch mit 10 Äquivalenten Donor bereits nach 6 Stunden vollständig abgelaufen war, während die Reaktion mit PRO-ALD(062) auch nach 24 Stunden noch unvollständig war. Bei der Reaktion von Fluoraceton wurde bei beiden DERA-Varianten eine Produktbildung beobachtet. Ein Hauptprodukt (t_R = 14.2 min) wurde relativ schnell gebildet, jedoch überlagerten sich die HPLC-Signale dieses Produktes mit dem des Edukts BSA (**59**, t_R = 14.1 min), sodass eine genaue Bestimmung des Reaktionsendes nicht eindeutig war. Mit steigender Reaktionszeit wurde die Ausbildung von zwei weiteren Produkten beobachtet, wobei vermutet wurde dass es sich dabei um das Additionsprodukt über die Fluormethylengruppe handelte (Kapitel 4.2.1).

4.2.1 DERA^{F200I}-katalysierte Umsetzung von BSA mit Aceton und Fluoraceton

Aceton (**223**) und Fluoraceton (**225**) wurden nach den positiven Ergebnissen des Screenings auch im präparativen Maßstab umgesetzt. Die Addition von Aceton (**223**) an BSA (**59**) mit DERA^{F200I} erfolgte mit 97% Ausbeute (Schema 92).

Schema 92. DERA^{F200I}-katalysierte Umsetzung von BSA (**59**) mit Aceton (**223**).

Bei der Addition von Fluoraceton (**225**) an BSA (**59**) mit DERA^{F200I} wurde in 43% Ausbeute ein Gemisch aus Regioisomeren isoliert, welches sich säulenchromatographisch nicht auftrennen ließ (Schema 93).



Schema 93. DERA^{F200L}-katalysierte Umsetzung von BSA (59) mit Fluoracetone (225).

Die niedrige Ausbeute ist vermutlich auf eine zu kurze Reaktionszeit oder Verlust des flüchtigen Nukleophils (Sdp. = 75 °C) zurückzuführen. Während der Reaktion konnte mittels HPLC die Bildung von drei Reaktionsprodukten beobachtet werden, wobei ein Produkt relativ schnell und die anderen beiden langsamer gebildet wurden. Das Ende der Reaktion konnte mittels HPLC nicht exakt bestimmt werden, da sich die Retentionszeiten des Hauptproduktes mit Fluoracetone (225) überlagerten. Aus den NMR-Spektren des Rohproduktes war abzuleiten, dass die Addition sowohl mit der Methyl- als auch von der Fluormethylengruppe von Fluoracetone (225) erfolgt, wobei vorwiegend die Addition über die Methylgruppe zu beobachten war. Die Reaktion wurde mit unterschiedlichen Reaktionszeiten wiederholt, um den Einfluss auf die Bildung der Regioisomere zu untersuchen (Tabelle 28).

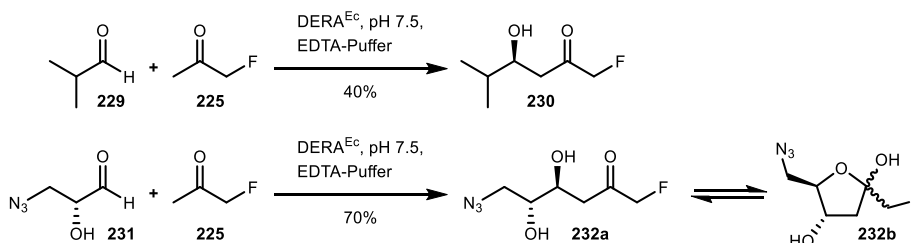
Tabelle 28. Untersuchung des Einflusses der Reaktionszeit auf die Regioselektivität der DERA^{F200L}-katalysierten Reaktion von BSA mit Fluoracetone.

#	Reaktionszeit [d]	Fluoracetone [eq]	Produktverhältnis ^a [%] 226 : 227 : 228
1	2	3.0	81 : 19 : 0
2	4	10.0	87 : 13 : 0
3	8	3.0	64 : 28 : 8

^aDie Diastereomeren Produkte 227 und 228 wurden nicht unterschieden.

Die Bildung des Methylenaddukts 226 ließ sich bereits nach zwei Tagen beobachten, wobei die Reaktion zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig abgelaufen war. Es ist ungeklärt, welches der beiden Regioisomere bevorzugt gebildet wird. Da unter diesen Reaktionsbedingungen jedoch kein einheitliches Reaktionsprodukt erhalten wurde sowie die Umsatzraten im Vergleich zu Aceton wesentlich geringer ausfielen, wurden weitere Untersuchungen vorerst zurückgestellt.

WONG *et al.* hatten für vergleichbare Reaktionen mit der DERA^{Ec} eine regioselektive Addition berichtet. Demnach soll Fluoracetone (225) an Isobutyraldehyd^[56] (229) und (*R*)-3-Azido-2-hydroxypropanal^[57] (231) ausschließlich über die Methylgruppe selektiv addieren (Schema 94).



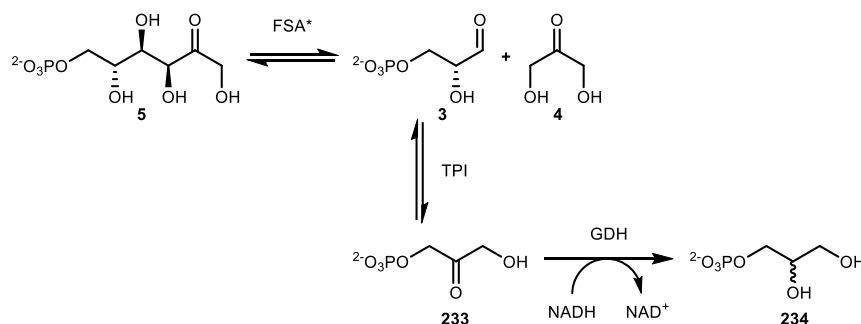
Schema 94. DERA^{Ec}-katalysierte Addition von Fluoracetone (225) an Isobutyraldehyd^[56] (229) und (*R*)-3-Azido-2-hydroxypropanal (231)^[57].

Da die DERA^{F200L} nur eine minimale Variation der Wildtyp DERA^{Ec} ist, ist davon auszugehen, dass die Regiopräferenz sehr ähnlich sein muss. Der Phenylrest in Position 200 befindet sich zwar in Peripherie des katalytisch aktiven Lysins in Position 167, aber nicht im aktiven Zentrum.^[134] SCHÜRMANN *et al.* wiesen nach, dass der Aminosäureaustausch zu Lysin auf die Enantioselektivität der Acetaldehydaddition keinen Einfluss ausübte.

Fluoraceton besitzt in etwa die gleiche Größe wie Aceton, sodass sterische Effekte ausgeschlossen werden können und eher von einem elektronischen Einfluss ausgegangen werden muss. Zudem ist nicht bekannt ob WONG *et al.* die Bildung von Regioisomeren erkannt hatten.

4.2.2 Untersuchung des inhibitorischen Effekts von BSA auf FSA^{A129S}

Bei den untersuchten FSA-Varianten konnte kein Umsatz mit BSA beobachtet werden. Es bestand die Vermutung, dass BSA wegen seiner Ähnlichkeit mit Glycerinaldehyd-3-phosphat inhibitorisch auf FSA wirkt. Es war daher von Interesse anhand von FSA^{A129S} exemplarisch nachzuweisen, ob die Anwesenheit von BSA das Enzym tatsächlich inhibiert. Mittels Aktivitätsassay wurde dazu in einer Retroaldolreaktion die Spaltung von D-Fructose-6-phosphat (D-F6P) mittels FSA^{A129S} zu D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyaceton gemessen. Der Assay beruht darauf, dass D-Glycerinaldehyd-3-phosphat durch Triosephosphat-Isomerase (TPI) in Dihydroxyacetonphosphat umgelagert wird. Dessen Reduktion durch die Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (GDH) unter NADH-Verbrauch zu D-Glycerin-1-phosphat kann photometrisch bei 340 nm (NADH) vermessen werden (Schema 95).



Schema 95. Zweistufiger enzymatischer Abbau von D-Fructose-6-phosphat zur Bestimmung der Aktivität von FSA-Varianten.

Die Reaktionsbedingungen des Assays sind in Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29. Reaktionsbedingungen des enzymatischen Assays zur Bestimmung der Aldolaseaktivität von FSA^{A129S}.

Reagenz	Konzentration	Volumen [μL]	Endkonzentration
NADH	50 mM ^a	1.5	0.75 mM
GDH/TPI ^b	Je 2.6–6.9 U	1.0	1–5 U/mL
D-F6P	1 M ^a	2.0	2 mM
BSA ^c	440 mM	X ^d	variabel
Gly-Gly-Puffer ^e	50 mM	190.5-X	~50 mM
FSA ^{A129S}	1 mg/mL ^a	5.0	5 μg

^ain Gly-Gly-Puffer; ^bEnzymmix, jeweils 2.6–6.9 U; ^cpH ≈ 7–8; ^dX = 0 (0 mM), 50 (65 mM), 100 (130 mM), 150 (195 mM). In Klammern die Endkonzentration in Lösung; ^emit 1 mM DTT, pH = 8.5.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von FSA^{A129S} gestartet, nachdem alle anderen Reagenzien in einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt wurden. Das Gesamtvolumen in der Assay-Reaktion betrug 200 μL, wobei BSA-Gesamtkonzentrationen von je 0, 65, 150 und 195 mM eingesetzt wurden. Um eine nicht-enzymatische Aktivität auszuschließen, wurde eine Blindmessung jeweils ohne FSA^{A129S} und BSA durchgeführt. Die Enzymaktivität lässt sich über den gekoppelten Verbrauch an NADH durch Abnahme der Absorption bei 340 nm feststellen (Abbildung 34).

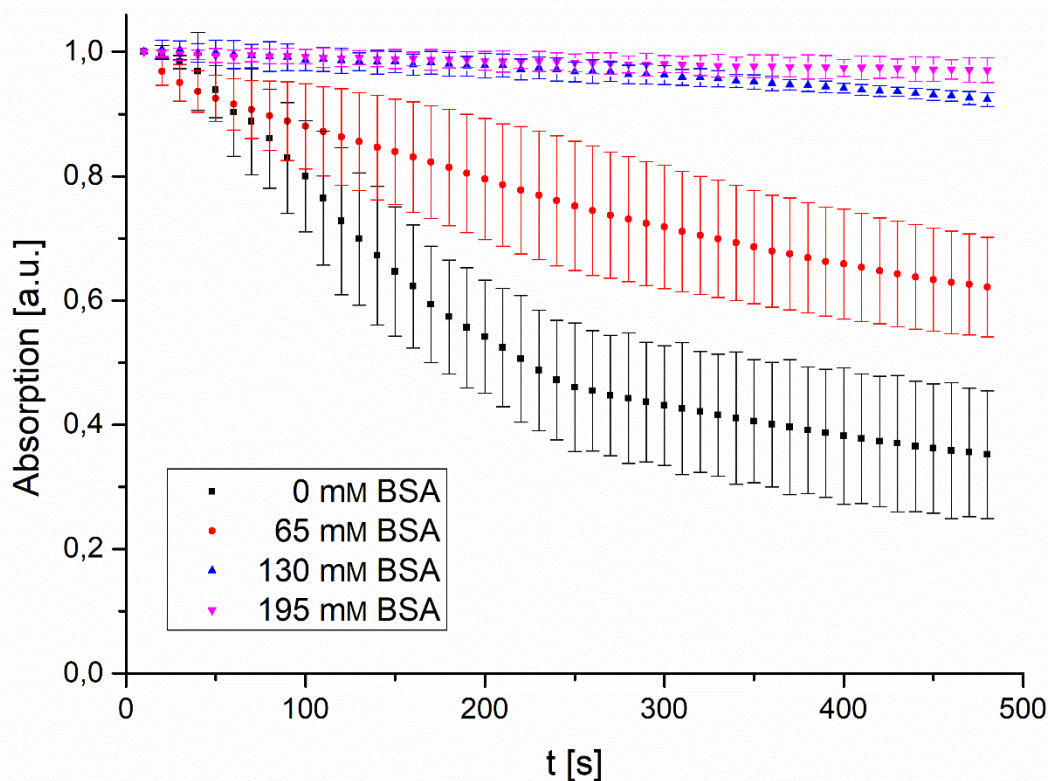
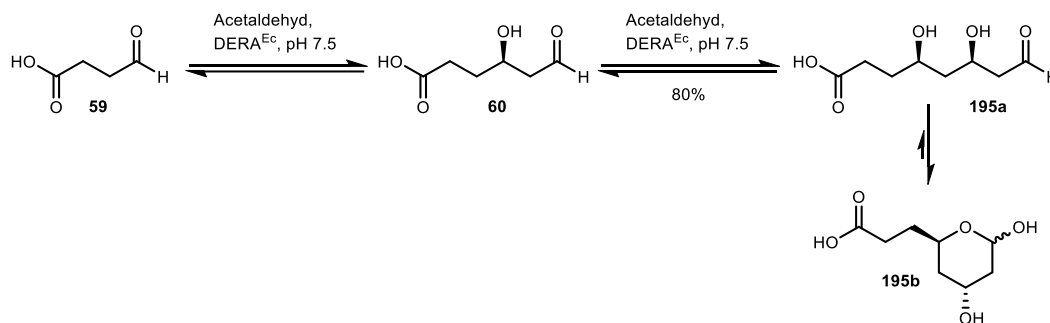


Abbildung 34. Untersuchung des Einflusses von BSA auf die Aktivität von FSA^{A129S}. Messung der zeitlichen Abnahme von NADH (Absorption bei 340 nm) bei einer Gesamtkonzentration von 0, 65, 130 und 195 mM BSA.

Die FSA^{A129S}-katalysierte Spaltung von D-F6P in Abwesenheit von BSA verläuft bis etwa 5 Minuten stetig und verlangsamt sich danach. Wird zur Reaktionsmischung BSA hinzugegeben, so ist bereits bei einer Konzentration von 65 mM BSA die Enzymaktivität der FSA^{A129S} um etwa die Hälfte abgeschwächt. Ab einer Konzentration von 130 mM BSA ist fast keine Enzymaktivität mehr zu erkennen. Anhand der gemachten Beobachtung lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei BSA um einen schwachen Inhibitor handelt, da die effektive Konzentration zur Inhibition ca. 10-fach höher als der K_M -Wert des Enzyms abgeschätzt werden kann. Da für FSA^{A129S} bisher kein K_M -Wert für die Spaltung von D-F6P publiziert wurde, kann hierzu näherungsweise der K_M -Wert von der FSA^{wt} ($K_M = 9 \text{ mM}$)^[27] zum Vergleich herangezogen werden. Die inhibitorische Wirkung von BSA auf die FSA könnte durch die kovalente Bindung der Aldehydfunktion an das katalytisch aktive Lysin (Lys85) sowie durch die Blockierung der Phosphatbindungsstelle für D-F6P durch die Carboxylatgruppe bedingt sein. Des Weiteren könnte während dieser Untersuchung das Aldolprodukt aus BSA mit DHA ((4R,5S)-4,5,7-Trihydroxy-6-oxoheptansäure) in geringen Mengen gebildet worden sein, was durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu D-F6P ebenfalls inhibitorisch wirken könnte. Letzteres scheint jedoch unwahrscheinlich, da während der HPLC-Analyse der Reaktion von BSA mit DHA (Tabelle 27) keine Produktbildung zu beobachten war. Erwartungsgemäß sollte sich dieser inhibitorische Effekt nicht nur auf FSA^{A129S}, sondern aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit auch auf FSA^{wt} und deren Varianten auswirken, wobei dies für FSA^{wt} jedoch nicht explizit getestet wurde. Bestärkt wird die Annahme dadurch, dass für die Reaktion von BSA mit HA unter Katalyse von FSA^{wt} ebenfalls keine Reaktion beobachtet wurde (Tabelle 27).

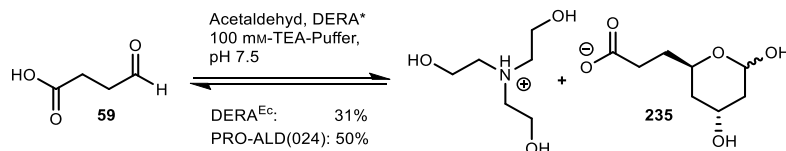
4.3 Synthese chiraler hydroxylierter C₈-Carbonsäurederivate

WONG *et al.* zeigten erstmals, dass BSA als Substrat in DERA-katalysierte Reaktionen mit Acetaldehyd eingesetzt werden kann, wobei das Lactol **195b** in 80% Ausbeute erhalten wurde (Schema 96).^[63] Wie in Kapitel 1.2.6 ausgeführt, sind die durch die Zweifachaddition erhaltenen Lactole potentiell nützliche Intermediate zur Synthese von Statinen.



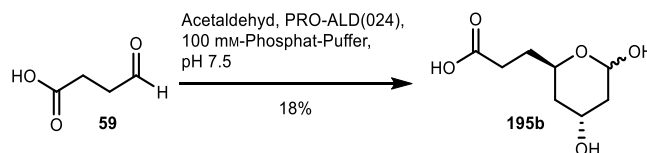
Schema 96. Erste DERA^{Ec}-katalysierte Reaktion mit Bernsteinsäuresemialdehyd.^[63]

Verschiedene DERA-Varianten wurden von vornherein auf eine katalytische Aktivität zur Umsetzung von BSA untersucht. Die effektivsten dabei gefundenen Varianten PRO-ALD(024) und PRO-ALD(062) wurden in der Reaktion zwischen BSA und Acetaldehyd eingesetzt und mit der DERA^{Ec} verglichen. Da die Testreaktionen im analytischen Maßstab mit TEA-Puffer stattfanden, wurde versucht, die Reaktionen im präparativen Maßstab ebenfalls in gepufferten Medium durchzuführen. Sowohl bei der Reaktion mit DERA^{Ec}, als auch bei der mit PRO-ALD(024) konnte das Zweifachadditionsprodukt **235** isoliert werden, wobei bei beiden Reaktionen das Produkt als Triethylammoniumcarboxylat-Salz isoliert wurde (Schema 97).



Schema 97. DERA^{Ec}- und PRO-ALD(024)-katalysierte Umsetzung von BSA (**59**) in TEA-gepufferter Lösung.

Es wurden zwei Methoden zur Aufarbeitung des Produkts getestet. Sowohl durch Ansäuern des Gemisches mit 2 M-Salzsäure und anschließender Extraktion mit Diethylether, als auch durch das Entfernen des Lösungsmittels und Extraktion mit Diethylether konnte das Lactol **195b** nicht isoliert werden.

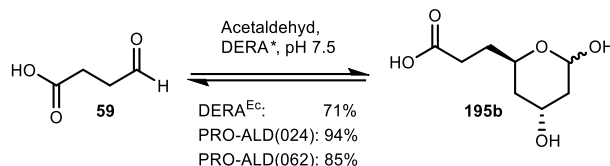


Schema 98. DERA^{Ec}- katalysierte Umsetzung von BSA (**59**) in Phosphat-gepufferter Lösung.

Da bei der Nutzung von TEA als Puffer eine Salzbildung zu beobachten ist, wurde die Reaktion mit PRO-ALD(024) unter gleichen Reaktionsbedingungen in Phosphat-Puffer durchgeführt, wobei das Lactol **195b** in einer Ausbeute von 18% erhalten wurde (Schema 98). Möglicherweise lag hier das Zielprodukt als Natrium-Salz vor, sodass dieses beim Aufreinigen nicht vollständig isoliert und daher eine vergleichsweise niedrigere Ausbeute erzielt wurde. Hierbei muss angemerkt werden, dass bei allen Reaktionen eine Aufreinigung über

Säulenchromatographie mit Kieselgel, welches schwach sauer ist, erfolgte. Zudem wurde die Reaktion nicht optimiert.

Da sowohl die Reaktionsausbeuten mit DERA^{Ec} und PRO-ALD(024) in TEA- als auch in Phosphatpuffer im Vergleich zur Literatur wesentlich niedriger ausfielen, wurde analog zur Literatur auf den Einsatz des Puffers verzichtet, wobei in regelmäßigen Abständen der pH-Wert der Reaktion manuell nachjustiert wurde. Bei den ungepufferten Reaktionen wurde BSA katalytisch durch DERA^{Ec}, PRO-ALD(024) und PRO-ALD(062) mit Acetaldehyd umgesetzt (Schema 99).

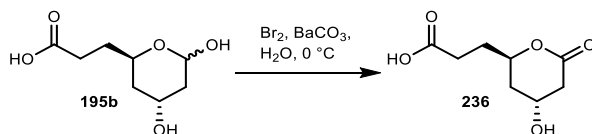


Schema 99. DERA-katalysierte Umsetzung von BSA mit Acetaldehyd.

Der Verzicht auf einen ermöglichte mit DERA^{Ec} eine ähnlich gute Ausbeute (71%) wie im von WONG publizierten Versuch (80%).^[63] Im Vergleich dazu verliefen die beiden Reaktionen mit den neuen DERA-Varianten mit Ausbeuten von 94% (PRO-ALD(024)) und 85% (PRO-ALD(062)) sogar etwas besser. Auch wenn die Reaktionsbedingungen noch nicht optimiert wurden, sind die beiden neu gefundenen DERA-Varianten in Bezug auf die Umsatzraten mit BSA gute Alternativen.

4.3.1 Derivatisierungsreaktionen

Nachdem die Synthese des Lactols **195b** optimiert werden konnte, wurden Derivatisierungen des Produkts anvisiert, um potentiell nützliche Bausteine für die Synthese von Statinen oder anderen Wirkstoffen zu erhalten. Da in Statinen die Seitenkette in der Regel als Lacton oder Carbonsäure vorliegt, wurde das Lactol **195b** mit Brom im Basischen zum Lacton **236** oxidiert (Schema 100).



Schema 100. Oxidation von Lactol **195b** mit Brom im Basischen.

Unter den gewählten Reaktionsbedingungen ließ sich zwar ein vollständiger Verbrauch des Edukts beobachten. Das gebildete Produkt ließ sich jedoch dünnstschichtchromatographisch trotz Einsatz diverser Färbemittel nicht sichtbar machen, was ein säulenchromatographisches Abtrennen des Zielprodukts von den gebildeten Salzen vereitelte. Daher lässt sich keine direkte Aussage auf die Effizienz der Oxidation treffen. NMR-spektroskopisch ließ sich das Produkt allerdings einwandfrei nachweisen. Es war jedoch noch durch eine weitere Verbindung verunreinigt (Anteil von etwa 10 bis 15%), welche sich nicht identifizieren ließ (Abbildung 35).

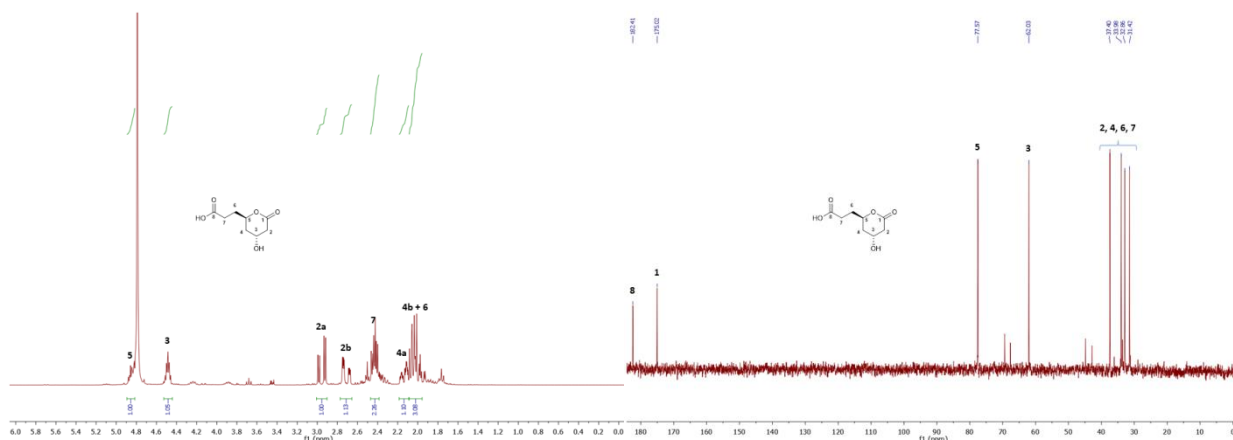
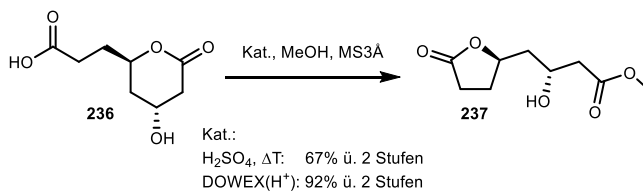


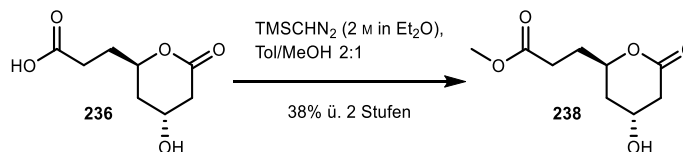
Abbildung 35. ^1H - und ^{13}C -NMR (300.1 MHz, D_2O) des unaufgereinigten Lactons **236**.

Ausgehend vom Lacton **236** bestand die Überlegung die freie Carbonsäure zum Ester umzusetzen. Die Versuche Lacton **236** im Säuren zum Methylester zu überführen führten jeweils nur zur Umesterung, unter Öffnung des δ -Lactons, wobei die im Edukt freie Carbonsäure wiederum zum γ -Lacton abreagiert ist. Mechanistisch gesehen sind Lactone bessere Elektrophile als Carbonsäuren. Trotz Einsatz eines Überschusses an Methanol konnte nicht der zweifache Methylester erhalten werden, sodass stattdessen nur der Monomethylester **237** erhalten werden konnte (Schema 101). Mechanistisch gesehen lässt sich die Bildung des γ -Lactons dadurch erklären, dass diese sowohl entropisch begünstigt ist als auch die Geometrie des intramolekularen Angriffs durch eine energetisch bevorzugte 5-*exo-trig*-Reaktion beschrieben werden kann.



Schema 101. Versuche zur Veresterung von Lacton **236**.

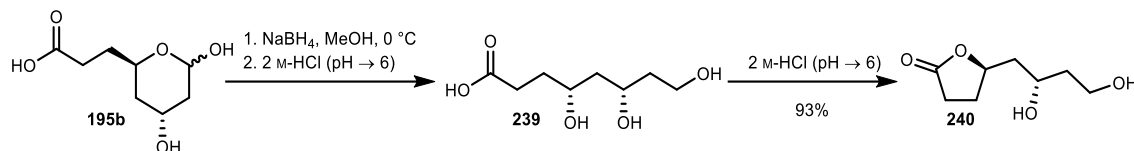
Eine Steglich-Veresterung der Carbonsäuregruppe von **236** war nicht möglich, da die freie sekundäre Hydroxygruppe nukleophil hätte angreifen können. Als Alternative wurde eine Veresterung mittels Trimethylsilyldiazomethan ausprobiert, was das erwartete Esterlacton **238** lieferte (Schema 102). Die schlechte Ausbeute von 38% über zwei Stufen lässt sich darauf zurückführen, dass das Lacton **236** zunächst nur als Rohsubstanz mit Verunreinigungen durch diverse Salze und einem nicht identifizierten Nebenprodukt aus der Vorstufe eingesetzt wurde, welche sich eventuell störend auf den Reaktionsverlauf auswirkten.



Schema 102. Veresterung von Lacton **236** mittels Trimethylsilyldiazomethan.

Das Lactol **195b** wurde zusätzlich reduktiv aufgearbeitet. Bei der Behandlung mit Natriumborhydrid kann die Carbonsäure **239** erhalten werden (Schema 103). Wird das Produkt bei der Aufarbeitung zu lange im Säuren

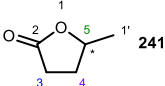
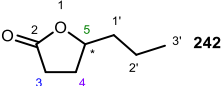
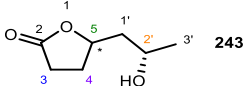
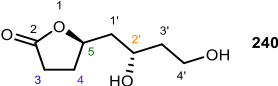
gehandhabt (> 15 min, pH << 4), kann eine intramolekulare Zyklisierung zum γ -Butyrolacton **240** in 93% Ausbeute beobachtet werden.



Schema 103. Reduktion des Lactols **195b** mit Natriumborhydrid und anschließende Zyklisierung im Säuren.

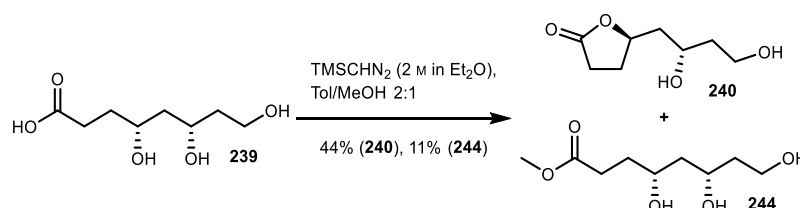
Ein Vergleich der ¹H-NMR-Signale des gebildeten Produkts mit 5-substituierten γ -Butyrolactonen (Tabelle 30) bekräftigt die Erwartung, dass diese Zyklisierung stattgefunden hat.

Tabelle 30. ¹H-NMR-Vergleich von 5-substituierten γ -Butyrolactonen mit dem hergestellten Lacton **240**.

 241	 242	 243	 240
δ^a [ppm] ^[192]	δ^b [ppm] ^[193]	δ^c [ppm] ^[194]	δ^d [ppm]
4.62 (q, 1H, <i>H</i> -5)	4.53–4.43 (m, 1H, <i>H</i> -5)	4.80–4.70 (m, 1H, <i>H</i> -5)	4.94–4.83 (m, 1H, <i>H</i> -5)
2.57–2.53 (m, 2H, <i>H</i> -3)	2.55 (dd, 2H, <i>H</i> -3)	4.10–4.00 (m, 1H, <i>H</i> -2')	3.99 (tt, 1H, <i>H</i> -2')
2.40–2.09 (m, 1H, <i>H</i> -4a)	2.36–2.24 (m, 1H, <i>H</i> -4a)	2.60–2.50 (m, 2H, <i>H</i> -3)	3.77 (t, 2H, <i>H</i> -4')
1.88–1.78 (m, 1H, <i>H</i> -4b)	1.90–1.34 (m, 5H, <i>H</i> -1', <i>H</i> -2', <i>H</i> -4b)	2.36 (ddd, 1H, <i>H</i> -4a)	2.74–2.65 (m, 2H, <i>H</i> -3)
1.41 (d, 2H, <i>H</i> -1')	0.93 (t, 3H, <i>H</i> -3')	2.00–1.70 (m, 3H, <i>H</i> -1', <i>H</i> -4b)	2.50 (dddd, 1H, <i>H</i> -4a)
		1.26 (s, 3H, <i>H</i> -3')	2.12–1.99 (m, 2H, <i>H</i> -1')
			1.97–1.69 (m, 3H, <i>H</i> -3', <i>H</i> -4b)

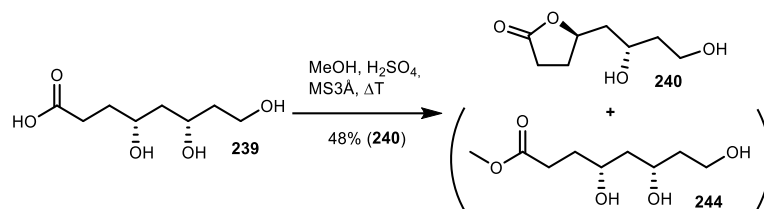
^a400 MHz, CDCl₃; ^b300 MHz, CDCl₃; ^c250 MHz, keine Lösungsmittelangabe; ^d300.1 MHz, CDCl₃.

Die Derivatisierung der Carbonsäure **239** zum Methylester **244** wurde alternativ mit TMS-Diazomethan oder mit Methanol im Säuren versucht. Im ersten Fall war zwar intermediär die Bildung des Methylesters zu detektieren, wobei jedoch offenbar direkt im Anschluss eine intramolekulare Zyklisierung zum γ -Butyrolacton **240** stattfand und der Methylester **244** immer nur in einem Gemisch mit dem Lacton **240** isoliert werden konnte. Daraus konnten der Methylester in 11% und das Lacton in 44% Ausbeute getrennt werden (Schema 104).



Schema 104. Versuch der Veresterung von Carbonsäure **239** mit Trimethylsilyldiazomethan.

Beim Versuch, die Carbonsäure mit Methanol im Sauren zum Methylester umzusetzen, wurden die gleichen Beobachtungen gemacht und erneut das γ -Butyrolacton **240** als Hauptverbindung in 48% Ausbeute isoliert, während der Methylester **244** diesmal nur in Spuren nachweisbar war (Schema 105).



Schema 105. Versuch der Veresterung von Carbonsäure **239** mit Methanol im Sauren.

Ausgehend von BSA lassen sich folglich (4*R*)-konfigurierte γ -Butyrolactone synthetisieren, wobei die Stereoinformation jeweils im DERA-katalysierten Reaktionsschritt determiniert wurde. Diese Lactonfunktionalität ist unter anderem in einer Vielzahl von Naturstoffen und biologisch aktiven Verbindungen enthalten. Funktionalisierte chirale Lactone kommen beispielsweise in Aromastoffen^[195-196], Sexuallockstoffen diverser Insekten^[197] und in Pflanzenwachstumsregulatoren^[198] vor. Außerdem sind sie wertvolle Bausteine für die Synthese von Naturstoffen^[199] wie Alkaloiden, makrozyklischen Antibiotika, Lignan-Lactonen, Pheromonen und Geschmacksstoffen.

Ein Beispiel für mögliche Anwendungen des γ -Butyrolactons **240** läge in der Verwendung als Synthone zur Synthese eines (+)-Discodermolid-Derivats. (+)-Discodermolid (**245**) stammt aus dem Metabolismus des maritimen Schwammes *Discodermia dissoluta*^[200] und weist wachstumsinhibierende Eigenschaften gegenüber menschlichen Zelllinien auf. Der Wirkmechanismus entspricht dem von Paclitaxel (Taxol),^[201-202] einem in der Medizin zur Behandlung diverser Krebsarten verwendeter Wirkstoff. SHAW *et al.* zeigten, dass durch Vereinfachen der Seitenkette von (+)-Discodermolid (**245**) zum γ -Butyrolacton **246** die Wirksamkeit des Wirkstoffs erhalten bleibt, so dass bei der Synthese auf den Aufbau von drei Stereozentren im Lactonring erfolgreich verzichtet werden kann (Abbildung 36).^[203]

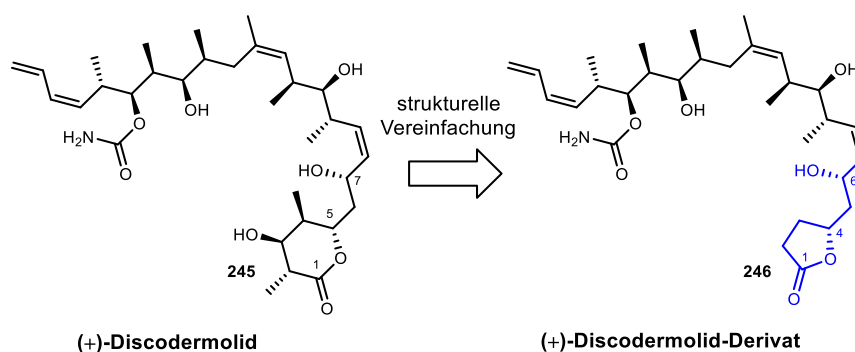
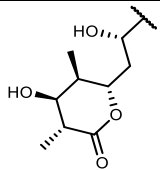
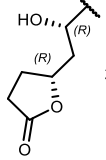
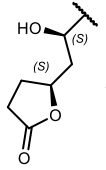


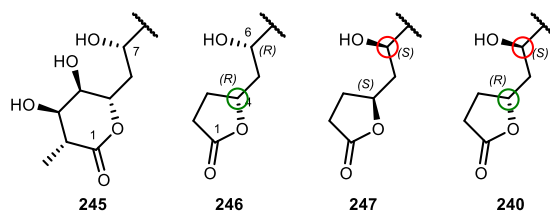
Abbildung 36. Strukturelle Vereinfachung von (+)-Discodermolid (**245**) zum γ -Butyrolacton-enhaltenden Derivat **246**.^[203]

Das durch reduktive Aufarbeitung erhaltene γ -Butyrolacton **195b** aus den DERA-katalysierten Reaktionen besitzt eine (*R,S*)-Konfiguration und ähnelt dem im (+)-Discodermolid-Derivat **246** enthaltenen Lacton (blau markiert), mit Ausnahme der Stereoinformation des sekundären Alkohols in Position 6. SHAW *et al.* synthetisierten sowohl das (*R,R*)- als auch das (*S,S*)-Isomer und testeten diese auf ihre Zytotoxizität gegenüber humanen Krebszelllinien (Tabelle 31).

Tabelle 31. Zytotoxizität von (+)-Discodermolid (**245**) und den Analoga **245**, **246** und **247** getestet auf vier humane Krebszelllinien.^[203]

Verbindung	IC ₅₀ [nM]			
	MCF-7	NCI-ADR	A549	CCRF-CEM
 245	28	240	22	16
 246	2.9	350	4.9	2.3
 247	390	<10000	2000	310

Wie sich zeigte, besitzt das (*R,R*)- γ -Butyrolacton **246** ähnlich gute Eigenschaften wie (+)-Discodermolid (**245**), während das (*S,S*)-Derivat **247** eine um 10- bis 100-fach schlechtere Aktivität aufweist. Das von BSA aus erhältliche (*R,S*)- γ -Butyrolacton **240** stimmt nur in Bezug auf die Stereoinformation in 4-Position mit dem wirksameren (*R,R*)-Substrat **246** überein. In 6-Position liegt hingegen eine Übereinstimmung mit dem weniger potenten (*S,S*)-Substrat **247** vor (Abbildung 37).

**Abbildung 37.** Vergleich der Stereozentren des aus BSA erhaltenem Lactons **240** mit (+)-Discodermolid (**245**) und dessen Analoga **246** und **247**. Grüner Kreis: Übereinstimmung mit dem wirksameren Substrat **246**. Roter Kreis: Übereinstimmung mit dem weniger potenten Wirkstoff **247**.

SMITH *et al.* zeigten mit Hilfe der Kristallstruktur von (+)-Discodermolid (**245**), dass die Hydroxygruppe in Position 7 aller Voraussicht nach eine Wasserstoffbrücke zum Ringsauerstoff des Lactons ausbildet.^[204] Analog sollte auch die Hydroxygruppe der (+)-Discodermolid-Analoga eine Stabilisierung bewirken. Es ist ungeklärt, ob das Stereozentrum der Analoga in Position 6 zwingend mit denen in (+)-Discodermolid (**245**) übereinstimmen muss oder ob nur die Stereoinformation in Position 4 einen Einfluss auf die biologische Wirksamkeit hat. Ausgehend von BSA ließe sich ein potentieller Baustein für auf (+)-Discodermolid basierten Zytotoxica herstellen der diesen Kontext aufklären könnte.

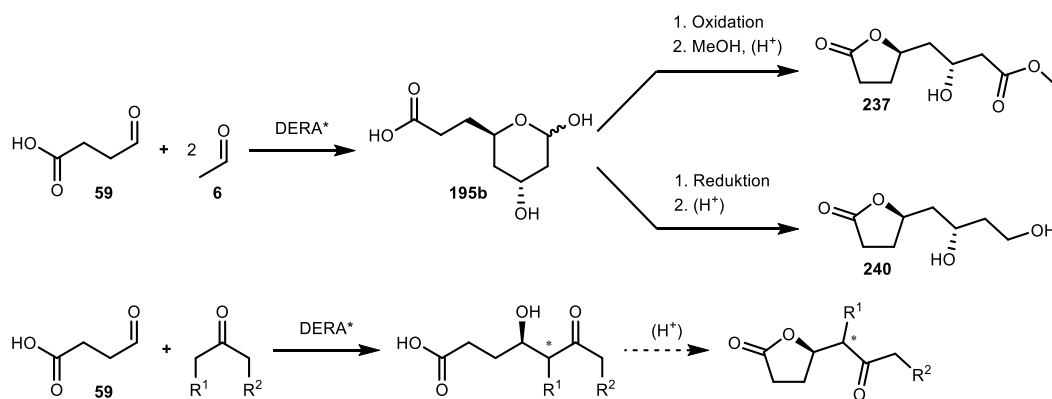
4.4 Zusammenfassung und Ausblick – DERA

DERA-katalysierte Reaktionen haben sich als wertvoll erwiesen, da in der Aldolreaktionen abhängig vom Donor mindestens ein neues Stereozentrum selektiv aufgebaut werden kann. Werden Acetaldehyd und dessen Derivate als Donoren verwendet, sind Mehrfachadditionen möglich, was die Synthese komplexerer Synthesebausteine in nur einem Reaktionsschritt erlaubt. WONG *et al.* zeigten dies bereits anhand von Additionen von Acetaldehyd an verschiedene Aldolakzeptoren.^[63] In dieser Studie wurde erstmals über die DERA^{Ec}-katalysierte Reaktion von BSA mit Acetaldehyd berichtet. BSA stellt eine zentrale Struktur dar, von der aus durch Aldolase-katalysierte Reaktionen mit weniger polaren sowie stabileren Aldoldonoren chirale hydroxylierte C₇/C₈-Carbonsäuren zugänglich sind, welche für die chemische Synthese von Wirk- und Werkstoffen interessant sind. Bisher existierten noch keine ausreichend praktikablen, kostengünstigen Synthesen für BSA. Im ersten Teil des Projekts sollte deshalb die Synthese von BSA für DERA- (und FSA-) katalysierte Reaktionen etabliert werden, was erfolgreich in einer neuen zweistufigen Reaktionsfolge gelang. Alle bisher veröffentlichten Synthesen weisen demgegenüber signifikante Nachteile auf, da sie entweder über viele Stufen ablaufen, teils nur geringe Gesamtausbeuten erzielen oder die eingesetzten Substrate relativ teuer sind. Die vorab als vielversprechend erhoffte Synthese ausgehend von 4-Pentensäure erwies sich hierbei als unvorteilhaft, da sich das bei der Reaktion als Nebenprodukt gebildete Formaldehyd inhibitorisch auf DERA-Varianten wirkt. Folglich müsste BSA destillativ aufgereinigt werden, was zu merkbaren Ausbeuteverlusten führt und einen unnötigen Mehraufwand bzw. Energieeinsatz aufgrund der Aufreinigungsprozedur bedeutet. Versuche, den gebildeten Semialdehyd in ein einheitlich geschütztes Substrat zu überführen, schlugen fehl. Allerdings verlief die Hydrolyse des Reaktionsgemisches zu BSA erfolgreich, sodass hier Optimierungsbedarf in der Schützungsreaktion besteht. Die hier etablierte zweistufige Synthese ausgehend von Furfural ist gerade durch die geringen Kosten und der umweltfreundlichen Herstellungsverfahren der eingesetzten Substrate von Vorteil. Zudem kann ein stabiler lagerfähiger Vorläufer von BSA erhalten werden, aus dem BSA schnell und effizient erzeugt werden kann. Ein großer Vorteil ist, dass beide Reaktionsschritte prinzipiell im Industriemaßstab umsetzbar sein sollten und Lösungen von BSA in 75% Gesamtausbeute über zwei Stufen erhalten werden können, bei denen kaum Nebenprodukte und Abfall anfallen.

In einem weiteren Projekt sollte die Substratbreite einer Auswahl an Aldolasen auf Aktivität mit unpolaren Aceton-basierten Aldoldonoren untersucht werden. Für unpolare Aldoldonoren wie Aceton oder Fluoraceton wurden bisher nur eine sehr begrenzte Anzahl von Ergebnissen publiziert. DERA-Varianten aus *Escherichia coli*^[136], *Arthrobacter chlorophenolicus*^[137] und *Maritima thermatoga*^[131] sind in der Lage, Aceton als Aldoldonor zu verwenden. Aus den in dieser Dissertation durchgeführten Testreaktionen von BSA mit Acetonderivaten ging hervor, dass die untersuchten Aldolasen DERA^{F200I} und PRO-ALD(062) in der Lage sind, unpolare Donoren wie Aceton und schwach polare Donoren wie Fluoraceton zu verwenden, womit chirale hydroxylierte C₇-Carbonsäuren erhalten werden können. Bei DERA^{F200I} wurden, anders als mit PRO-ALD(062), mit Aceton und Fluoraceton schnellere Umsätze beobachtet. Entgegen der von WONG publizierten Ergebnisse^[56-57] besteht jedoch die Vermutung, dass die Addition von Fluoraceton nicht ausschließlich über die Methylgruppe erfolgt. Die Ursache für die ungenügende Regioselektivität gilt es in weiteren Studien zu klären. Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass die Fluorgruppe einen ausreichend starken elektronischen Einfluss hat, wobei sich der Aldoldonor im aktiven Zentrum unselektiv orientiert und somit keine regioselektive Addition mehr stattfinden kann. Es ist ungeklärt, ob WONG *et al.* die Bildung von Regioisomeren eventuell nicht beobachtet haben. Sterische Einflüsse von Substituenten in der Enzymtasche sind auszuschließen, da sich sowohl bei der DERA^{F200I}

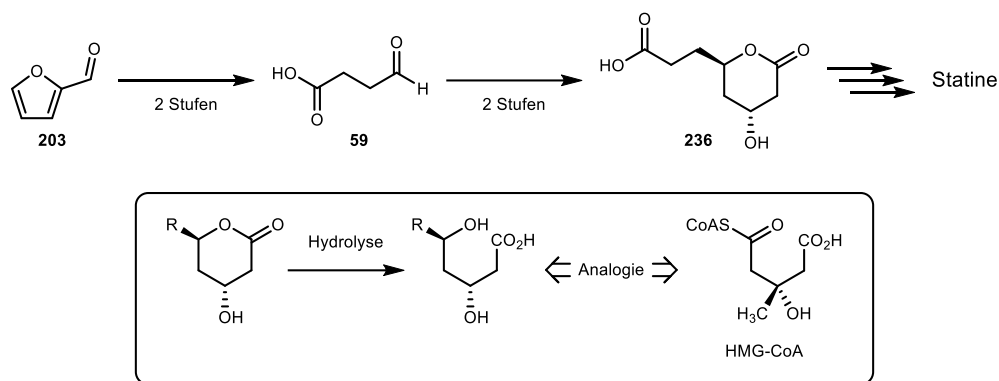
als auch der PRO-ALD(062) die Ausbildung von Regiosomeren erkennen ließ, wobei PRO-ALD(062) nur eine Ähnlichkeit von nur etwa 50% zu DERA^{F200I} aufweist. Die hier durchgeführten Versuche mit 1,3-Difluoraceton als Donor schlugen fehl. Sofern das Substrat im aktiven Zentrum gebunden werden kann, wäre es vermutlich aufgrund der elektronenziehenden Effekte der beiden Fluoratome als Enamin nicht nukleophil genug, um als Aldoldonor zu fungieren. Bei den FSA-katalysierten Synthesen wurde mit BSA kein Umsatz beobachtet. Durch ein Aktivitätsassay von FSA^{A129} anhand der Spaltung von D-Fructose-6-phosphat konnte gezeigt werden, dass BSA auf das Enzym inhibierend wirkt. Letztendlich zeigt sich, dass BSA kein gutes Substrat für FSA^{wt}, FSA^{A129S} und FSA^{D6H} ist.

Anhand weiterer Reaktionen zwischen BSA und Acetaldehyd konnten zwei neue DERA-Orthologe identifiziert werden, die eine Aldolreaktionen ermöglichen und sogar die von WONG publizierten Ergebnisse übertreffen.^[63] Die PRO-ALD(024) und PRO-ALD(062) von *Prozomix* stellen im Vergleich zu DERA^{Ec} folglich gute Alternativen mit ähnlichen Umsatzraten und etwas besseren Ausbeuten dar. Durch die Derivatisierung der entstandenen Produkte aus BSA und Acetaldehyd ist es möglich, chirale C₈-Carbonsäuren/Lactone synthetisch zugänglich zu machen, welche z. B. als Bausteine für die zukünftige Synthese von Statinen dienen können. Letzteres wurde im Rahmen dieser Arbeit exemplarisch gezeigt und unterschiedlich funktionalisierte Synthesebausteine hergestellt (Schema 106, oben). Diese können in Zukunft dazu dienen, das Spektrum an komplexen Hydroxy-funktionalisierten Naturstoffen zu erweitern. Wie bei den chiralen C₈-Carbonsäuren gezeigt, könnten ausgehend von C₇-Carbonsäuren hypothetisch ebenfalls γ -Butyrolactone hergestellt werden (Schema 106, unten).



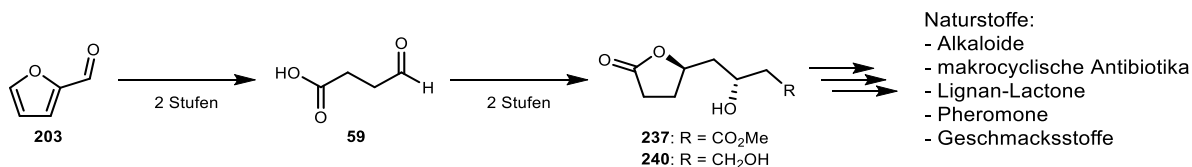
Schema 106. Synthese chiraler, funktionalisierter C₈- (oben) und C₇- γ -Butyrolactone (unten).

Durch weitere Reaktionsscreenings könnten zusätzlich DERA-Varianten gefunden werden, welche Aceton-basierte Donoren an BSA addieren können. Hierdurch könnten an der Seitenkette substituierte γ -Butyrolactone erhalten werden, welche für die Synthese von Naturstoffen oder pharmakologischen Wirkstoffen genutzt werden können.^[199] Das synthetisierte C₈-Lacton **236** besitzt mit seiner δ -Lactonseitenkette ein Strukturmerkmal, welches durch Hydrolyse in 3,5-Dihydroxycarbonsäuren überführt werden kann, welche eine strukturelle Analogie zu HMG-CoA aufweisen. Notwendig ist dieses Strukturmerkmal in Statinwirkstoffen und könnte wie bereits zuvor beschrieben als Fragment für die Synthese neuartiger Statine dienen (Schema 107).



Schema 107. Mögliche Verwendung des C₈-δ-Lactons **236** für die Synthese neuartiger Statine.

Das γ-Butyrolacton-Strukturelement wurde bisher in Alkaloiden, makrocyclischen Antibiotika, Lignan-Lactonen, Pheromonen und Geschmacksstoffen gefunden.^[199] Die hier hergestellten C₈-γ-Butyrolactone **237** und **240** stellen zudem mögliche Bausteine für die Synthese von (+)-Discodermolid-Varianten dar, welche einen Nutzen als Anti-Krebsmedikament finden können (Schema 108).



Schema 108. Mögliche Verwendung der C₈-γ-Butyrolactone **237** und **240** für Naturstoffsynthesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit entwickelte Synthese von BSA und die weiterführenden Studien in Zukunft dazu beitragen werden, mit dem nun leichter zugänglichen Substrat umfangreichere Studien an einem breiten Spektrum an Donor-Substituenten zu erlauben. Dies wird das Spektrum an umweltfreundlichen Aldolreaktionen insbesondere durch DERA-Katalyse deutlich erweitern und die Synthese von sonst schwierig zugänglichen chiralen Bausteinen, wie sie zum Beispiel in der Synthese von Wirkstoffen benötigt wird, kostengünstig machen.

5 Experimentalteil

5.1 Messgeräte und Messmethoden

5.1.1 Allgemeines

Alle Reaktionen, sofern nicht anders vermerkt, wurden bei 20–25 °C unter Rühren mittels eines Magnetrührers durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben enthalten (salzhaltige) Lösungen Wasser als Lösungsmittel. Destillationen mit dem Vermerk „im Vakuum entfernt“ erfolgten unter Zuhilfenahme eines Rotationsverdampfers unter Membranpumpenvakuum und bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C. Die Trocknung der Substanzen erfolgte im Hochvakuum einer Ölpumpe. Reaktion unter –50 °C wurden mit einem Gemisch aus 2-Propanol/Trockeneis gekühlt. Reaktionen bei 0 °C wurden mit Eis gekühlt.

5.1.2 Lösungsmittel

Die Absolutierung der verwendeten Lösungsmittel erfolgte mit Trocknungsmitteln und anschließender Destillation nach den entsprechenden Standardverfahren:^[205]

- Methanol: Magnesium
- Tetrahydrofuran: Natrium/Benzophenon
- Dichlormethan: Calciumhydrid
- Diethylether: Natrium/Benzophenon

Bei fehlender Bezeichnung „abs.“ wurden Lösungsmittel der Reinheitsstufe pro analysi (p.a.) eingesetzt. Das zur Säulenchromatographie eingesetzte Cyclohexan wurde vor dem Einsatz destilliert. Deuteriertes Chloroform zur Probenvorbereitung von NMR-Messungen wurde über basischem Aluminiumoxid (AlOx 60, basisch) gelagert, um Säurespuren zu entfernen.

5.1.3 Chromatographiemethoden

5.1.3.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die analytische Dünnschichtchromatographie zur Reaktionskontrolle wurden kieselgelbeschichtete Aluminiumplatten der Firma *Macherey-Nagel* (Kieselgel 60 mit Fluoreszenz-Indikator UV₂₅₄) verwendet. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) und unter Verwendung der folgenden Anfärbereagenzien:^[206]

- Anisaldehyd-Färbereagenz: 200 mL EtOH (abs.), 7.5 mL H₂SO₄ (konz.), 2.2 mL AcOH, 5.5 mL Anisaldehyd
- Seebach-Färbereagenz: 90 mL H₂O, 10 mL H₂SO₄ (konz.), 5.0 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 1.0 g Ce(SO₄)₂·2H₂O
- Kaliumpermanganat-Färbereagenz: 1.0 g KMnO₄, 5.0 g K₂CO₃, 1.75 mL NaOH (aq, 1 M), 100 mL H₂O
- DNPH-Färbereagenz: 0.3 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin, 20 mL H₂O, 50 mL EtOH, 15 mL H₂SO₄ (konz.)
- Zucker-Färbereagenz: 50 mg *N*-(1-Naphtyl)-ethylendiamin, 200 mL MeOH, 10 mL H₂SO₄ (konz.)
- Bromkresolgrün-Färbereagenz: 100 mL EtOH, 40 mg Bromkresolgrün, Zugabe von NaOH (aq, 0.1 M) bis Lösung blau gefärbt ist

Die DC-Platten wurden in die jeweilige Lösung getaucht. Beim DNPH- und Bromkresolgrün-Färbereagenz tritt eine direkte Färbung auf. Beim Anisaldehyd-, Seebach-, Kaliumpermanganat- und Zucker-Färbereagenz wurden die DC-Platten anschließend unter Wärmeeinwirkung mittels einer Heizpistole entwickelt. Die angegebenen Laufmittelgemische entsprechen Volumenverhältnissen.

5.1.3.2 Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte an Kieselgel einer Partikelgröße von 0.060–0.200 mm der Firma *Acros Organics*. Beim Einsatz einer Mikrosäule wurde Kieselgel mit einer Partikelgröße von 0.040–0.063 mm der Firma *Roth* verwendet. Die vermerkten Laufmittelgemische entsprechen Volumenverhältnissen.

5.1.3.3 HPLC

Die Aufnahme von HPLC-Daten erfolgte mit einer HPLC-Anlage der Firma *Shimadzu* mit einem SPD-M20A UV-Diodenarraydetektor. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 215$ nm und die Flussrate betrug von 0.400 mL/min. Als Laufmittel wurden Wasser + 0.1% Ameisensäure (Lösungsmittel A) sowie Acetonitril + 0.1% Ameisensäure (Lösungsmittel B) verwendet. Als Säule wurde eine Xbridge™ C18 (Porengröße: 3.5 μ m, Länge: 150 mm, Durchmesser: 3.0 mm) der Firma *Waters* (Milford, USA) eingesetzt und die Messungen bei 40 °C durchgeführt. Für die Aufnahmen wurden Proben mit einer Konzentration von etwa 0.1 mg/mL in Methanol (HPLC-grade) vorbereitet.

5.1.3.4 Probenpräparation für HPLC-Messungen:

Aldehyd- bzw. ketonhaltige Reaktionsproben (100 μ L, 10 μ L), welche keine chromophore Gruppe im Molekül enthalten, wurden mit Derivatisierungsreagenz (50 μ L, Stammlösung: 210 mg *O*-Benzylhydroxylaminhydrochlorid, 6.6 mL Pyridin, 3.0 mL MeOH, 400 μ L H₂O) gemischt und für 60 min bei 50 °C in einem Heizblock erhitzt. Im Anschluss wurde die Probe mit MeOH (HPLC-grade) auf 1.0 mL aufgefüllt, für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und dann mittels HPLC analysiert.⁶

5.1.3.5 HPLC-Messmethode

HPLC-Proben wurden mit der folgenden Methode analysiert:

- 0 min → 30 min: 10% B → 90% B
- 30 min → 31 min: 90% B → 95% B
- 31 min → 34 min: 95% B
- 34 min → 36 min: 95% B → 10% B
- 36 min → 40 min: 10% B

Die verwendeten Laufmittel setzten sich wie folgt zusammen:

- Lösungsmittel A: Wasser + 0.1% Ameisensäure
- Lösungsmittel B: Acetonitril + 0.1% Ameisensäure

⁶ Bei Aldehyden und Ketonen können durch die Derivatisierung (*E*)- und (*Z*)-Isomere gebildet werden. Für den Fall, dass beide Isomere beobachtet wurden, wird dies explizit bei den Reaktionen erwähnt.

5.1.3.6 Gaschromatographie (GC)

Die Aufnahme von GC-Daten erfolgte mit einer GC-Anlage des Typs *GC-17A* der Firma *Shimadzu* und die Chromatogramme wurden mit der Software *Shimadzu CLASS VP* ausgewertet. Als Säule wurde eine *Rt®-bDEXsm* (Länge: 30 m, Innendurchmesser: 0.25 mm, Porengröße: 0.25 μm) der Firma *RESTEK* (Bad Homburg, Deutschland) mit Stickstoff als Trägergas eingesetzt. Für die Messungen wurden Proben mit einer Konzentration von etwa 0.1 mg/mL in MeOH (HPLC-grade) vorbereitet.

5.1.3.7 GC-Messmethode

Als Standardmessmethode wurde die Methode nach PURDER *et al.* angewandt.^[143] Der Injektor und der Detektor wurden auf 200 °C bzw. 230 °C eingestellt. Die anfängliche Säulentemperatur betrug 90 °C. Die Temperatur wurde anschließend mit einer Geschwindigkeit von 0.5 °C/min auf 100 °C erhöht und 1 min bei dieser Temperatur gehalten. Danach wurde die Temperatur mit einer Geschwindigkeit von 20 °C/min auf 160 °C erhöht.

5.1.4 Gefriertrocknung

Das Gefriertrocknen (Lyophilisieren) von Proben erfolgte an einer Lyophille des Typs *LyoQuest* der Firma *Telstar*.

5.1.5 HR-ESI-Massenspektrometrie

Die Aufnahme von ESI-Massenspektren erfolgte mit einer MS-Anlage des Modells *Impact II* der Firma *Bruker Daltonik*. Als Analysator wurde ein Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer verwendet. Für die Messungen wurden Proben mit einer Konzentration von 0.1 mg/mL in MeOH (HPLC-grade) vorbereitet und über einen Spritzenfilter filtriert.

5.1.6 NMR-Spektroskopie

Alle Proben wurden in deuteriertem Lösungsmittel gelöst und an einem der folgenden Geräte vermessen:

- *Bruker* 300 MHz Avance II: 300 MHz ^1H -NMR und 75.5 MHz ^{13}C -NMR
- *Bruker* 300 MHz Avance III: 300 MHz ^1H -NMR, 75.5 MHz ^{13}C -NMR, ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{13}C -HMBC und ^1H - ^1H -NOESY
- *Bruker* 500 MHz DRX 500: 500 MHz ^1H -NMR und 125.8 MHz ^{13}C -NMR

Die angegebenen Werte der chemischen Verschiebung beziehen sich auf das Signal des jeweils verwendeten deuterierten Lösungsmittels, relativ zum Tetramethylsilanstandard bei $\delta = 0$ ppm:^[207]

- CDCl_3 : $\delta(^1\text{H}) = 7.26$ ppm, $\delta(^{13}\text{C}) = 77.16$ ppm
- D_2O : $\delta(^1\text{H}) = 4.79$ ppm
- Methanol- d_4 : $\delta(^1\text{H}) = 3.31$ ppm, $\delta(^{13}\text{C}) = 49.00$ ppm

Bei den ^{13}C -NMR-Spektren wurde eine ^1H -Breitbandentkopplung vorgenommen. Die erhaltenen Spektren wurden mittels der Software *MestReNova* ausgewertet.

5.1.7 Schmelzbereiche

Die Schmelzbereiche wurden mit einem SMP-20 Heizgerät der Firma *Büchi* bestimmt und sind nicht korrigiert.

5.1.8 UV/Vis-Spektren

Die Messung der UV/Vis-Spektren von 96-well Mikrotiterplatten erfolgte an einem Mikrotiterplatten-Lesegerät des Modells *SPECTRAMAX 190* der Firma *Molecular Devices*. Die Messung wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340$ nm durchgeführt und die Auswertung erfolgte mit dem Programm *SoftMax Pro 6.5.1*.

5.1.9 Ozonolysen

Ozonolysen wurden an einem Ozon-Generator der Firma *Fischer* (Modell 502) bei einer Leistung von 80% durchgeführt.

5.2 Allgemeine Arbeitsmethoden

Aktivierung von DOWEX®(H⁺)

Eine gewünschte Menge DOWEX® 50 WX8 (Partikelgröße: 100-200 mesh, Gegenion: H⁺, Kapazität: 2.0 eq/L, Verlust durch Trocknen: 50%) der Firma *Serva* wird in einer Fritte (P4) solange mit H₂O gewaschen, bis das Waschwasser klar ist. Anschließend wird mit HCl-Lsg. (2 M) gewaschen und dann solange mit H₂O gewaschen bis das Waschwasser neutral ist. Danach wird mit MeOH (abs.) gewaschen und das DOWEX®(H⁺) im Vakuum von Lösungsmittelresten befreit. Das auf diese Weise aufgereinigte DOWEX®(H⁺) wird direkt für Reaktionen eingesetzt.

Säulenchromatographie mit Mikrosäule

Eine Pasteurpipette mit kurzer Spitze wird mit einem Stück Watte versehen und trocken mit Kieselgel (Partikelgröße: 0.040–0.063 mm) befüllt. Die aufzureinigende Probe wird auf Kieselgel absorbiert und auf das, in der Pasteurpipette befindliche, Kieselgel geschichtet. Als Letztes wird die oberste Schicht mit einer kleinen Schicht Seesand bedeckt. Das Lösungsmittel wird direkt auf die trockene Säule gegeben, wobei ein Glastrichter als Lösungsmittelreservoir verwendet werden kann.

Exprimierung von FSA* in *E. coli*

Exprimierungsprotokoll:

Zu einem AI-Medium (1 L) wird Ampicillin Natriumsalz (100 mg/mL, 1 mL) gegeben und mit *E. coli* BL21(DE3) (Plasmidvektor pET16b-FSA^{wt} bzw. FSA^{A129S}) aus einem Glycerolstock angeimpft. Das Medium wird in Erlenmeyerkolben mit Schikanen aufgeteilt, wobei diese zu maximal ¼ des Gesamtvolumens befüllt werden. Anschließend wird für 24 h bei 37 °C und 230 rpm (*Certomat® HK* Schüttler mit Heizhaube der Firma *B. Braun Melsungen*) geschüttelt. Die Lösung wird danach für 30 min bei 4000 rpm (2250 g) in einem A-4-62 Eppendorfrotor (Zentrifugenmodell 5810 der Firma *Eppendorf*) zentrifugiert und der Überstand abdekantiert.

Das Zellpellet wird in TEA-Puffer (50 mM TEA, 100 mL, pH 7.5, 1 mM DTT) aufgenommen.⁷ Anschließend erfolgt die Zugabe von Lysozym (1 mg pro 1 mL) und DNaseA (1 mg/mL, 100 µL pro 100 mL gepufferte Lösung). Die resultierende Mischung wird 1 h bei 37 °C lysiert, dann 30 min bei 70 °C gerührt und anschließend für 30 min bei 8000 rpm (8228 g) in einem F40-6-38 Eppendorfrotor (Zentrifugenmodell 5804 der Firma *Eppendorf*) zentrifugiert. Der Überstand wird in einer Ultrafiltrationszelle (Modell Vivacon 250 der Firma *Sartorius AG*) unter Stickstoffdruck (4 bar) filtriert und mit TEA-Puffer (50 mM, 20 mL pro 1 L eingesetztem AI-Medium, pH 7.5, 1 mM DTT) gewaschen. Im Anschluss wird die Lösung lyophilisiert wobei FSA* als farbloser, watteartiger Feststoff (Etwa 0.5–1.0 g) erhalten wird.

Herstellung von 1 L AI-Medium:^[208]

1.) Zusammengeben von:

- 898 mL H₂O
- 10.00 g Trypton
- 5.00 g Bäckerhefe-Extrakt
- 2.68 g NH₄Cl
- 0.71 g Na₂SO₄
- 5.88 g Glycerol (85%)
- 0.50 g Glucose
- 2.00 g Lactose

2.) Autoklavieren

3.) Abkühlen auf Raumtemperatur, dann folgendes zugeben:

- 1 mL MgSO₄-Lsg. (2 M, 0.22 µm filtersterilisiert)
- 1 mL Spurenelement-Lsg. (s.u.)⁸
- 1 mL Antischaumemulsion von *Roth*
- 40 mL K₂HPO₄-Lsg. (1 M, autoklaviert) oder 136.64 g K₂HPO₄ pro 1 L AI-Medium.
- 10 mL KH₂PO₄-Lsg. (1 M, autoklaviert) oder 27.20 g KH₂PO₄ pro 1 L AI-Medium.

Die Anteile pro 1 L AI-Medium ergeben sich wie folgt: 1.0 Gew.-% Trypton, 0.5 Gew.-% Bäckerhefe-Extrakt, 50 mM NH₄Cl, 5 mM Na₂SO₄, 0.5 Gew.-% Glycerol, 0.05 Gew.-% Glucose, 0.2 Gew.-% Lactose, 2 mM MgSO₄, Spurenelemente, 40 mM K₂HPO₄ und 10 mM KH₂PO₄.

Herstellung von 100 mL Spurenelement-Lösung (in Klammern die Mengenangaben der jeweiligen Stammlösung):^[208]

- 36 mL H₂O (Millipore)
- 50 mL FeCl₃·6H₂O⁹ (0.1 M) (2.70 g/100 mL)
- 2 mL CaCl₂·2H₂O (1.0 M) (15.8 g/100 mL)
- 1 mL MnCl₂·4H₂O (1.0 M) (19.8 g/100 mL)
- 1 mL ZnSO₄·7H₂O (1.0 M) (28.8 g/100 mL)

⁷ Die Lösung kann ab diesem Schritt bei –20 °C zwischengelagert werden.

⁸ Die Zugabe der Spurenelement-Lsg. kann im Fall von FSA auch weggelassen werden.

⁹ Die Stammlösung besteht aus FeCl₃·6H₂O (2.70 g, 10.0 mmol) in HCl-Lsg. (0.12 M, 50 mL).

- 1 mL $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.2 M) (4.76 g/100 mL)
- 2 mL $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1 M) (1.70 g/100 mL)
- 1 mL $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.2 M) (4.76 g/100 mL)
- 2 mL $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1 M) (2.42 g/100 mL)
- 2 mL Na_2SeO_3 (0.1 M) (1.73 g/100 mL)
- 2 mL H_3BO_3 (0.1 M) (0.62 g/100 mL)

Die Gesamtkonzentrationen ergeben sich wie folgt: 50 mM FeCl_3 , 20 mM CaCl_2 , 10 mM MnCl_2 , 10 mM ZnSO_4 , 2 mM CoCl_2 , 2 mM CuCl_2 , 2 mM NiCl_2 , 2 mM Na_2MoO_4 , 2 mM Na_2SeO_3 , 2 mM H_3BO_3 .

5.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV1 Zink-vermittelte Allylierung von Ketonen mit Allylbromid nach Barbier^[142]

Eine Mischung aus dem entsprechenden Keton (1.0 eq) in ges. NH_4Cl -Lsg. (1000 mL pro 1 mol Substrat) und Et_2O bzw. THF (300 mL pro 1 mol Substrat) wird mit Allylbromid (2.5 eq) versetzt. Unter Eiskühlung wird portionsweise Zinkpulver (2.0–2.5 eq pro Ketogruppe) zugegeben, sodass die Innentemperatur 40 °C nicht übersteigt. Im Anschluss wird die Mischung über eine Fritte (P4) filtriert, mit Et_2O gewaschen, die organische Phase separiert und die wässrige Phase dreimal mit Et_2O extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über MgSO_4 getrocknet und die Lösung bei 40 °C (700 mbar) eingeeengt. Abhängig vom Substrat wird das Produkt anschließend entweder fraktionierend im Vakuum destilliert oder säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt.

AAV2a,b Ozonolyse von Olefinen

Das Olefin (1.00 eq) wird in MeOH (abs., 6 mL pro 1 mmol) gelöst, auf –78 °C gekühlt und mit einem stetigen O_2 -Gasstrom gesättigt. Anschließend wird die Lösung bei –78 °C mit O_3 durchspült bis eine schwache Blaufärbung der Lösung zu erkennen ist. Es wird 5 min mit O_2 gespült, dann Dimethylsulfid (1.25–2.00 eq) zur Lösung gegeben und gerührt bis das Reaktionsgemisch Raumtemperatur erreicht hat.

Anschließend wird das Reaktionsgemisch entweder nach Methode **a)** oder **b)** aufgearbeitet:

- a)** Zur methanolischen Lösung wird H_2O zugegeben und die Lösung im Vakuum eingeeengt, sodass, abhängig vom Substrat, eine 250 bzw. 500 mM wässrige Lösung erhalten wird.¹⁰
- b)** Zur methanolischen Lösung wird $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ (1:4) zugegeben und die Lösung im Vakuum eingeeengt, sodass, abhängig vom Substrat, eine 250 bzw. 500 mM Lösung erhalten wird.

Die Reaktionslösung wird ohne weitere Aufreinigung in Folgereaktionen eingesetzt.

Zur NMR-spektroskopischen Analyse wird ein Anteil der methanolischen Lösung mit ca. 1 mmol Substrat (etwa 6 mL Lösung) mit D_2O (0.7 mL) versetzt und die Lösung im Vakuum mittels Kryotransfer auf 0.3–0.4 mL Volumen eingeeengt und auf ein Gesamtvolumen von 0.7 mL mit D_2O aufgefüllt. Zusätzlich kann die Ozonolyse des Olefins

¹⁰ Bei terminalen Olefinen tritt Formaldehyd als Nebenprodukt auf, welches durch abwechselndes Einengen und Zugeben von Lösungsmittel nicht vollständig entfernbar ist (Kapitel 3.1.3.1).

(1 mmol) in Methanol- d_4 (2.0–2.5 mL) durchgeführt werden und ein Teil der Lösung (0.7 mL) direkt NMR-spektroskopisch vermessen werden.

AAV3 Testreaktionen zur FSA*-katalysierten Umsetzung von Aldehyden mit Hydroxy- bzw. Dihydroxyaceton

In ein Eppendorf-Gefäß (1.5 mL) wird eine wässrige Lösung des Aldehyds (50 μ mol, 1 eq), eine wässrige Lösung von Hydroxy- (HA) oder Dihydroxyaceton (DHA, 150–500 μ mol, 3–10 eq) und TEA-Puffer (1 M, 25 μ L, pH 7.5) gegeben und mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 500 μ L aufgefüllt. Es wird FSA* (1.5 mg, FSA^{wt} bei HA bzw. FSA^{A129S} bei DHA) zugegeben und die Lösung auf pH 7.5 eingestellt. Die Reaktionsmischung wird geschüttelt (200 rpm) und der Fortschritt der Reaktion mittels DC und HPLC verfolgt, bis kein weiterer Umsatz mehr detektierbar ist. Die genauen Mengenangaben können dem Substratscreening aus Tabelle 32 entnommen werden.

AAV4a,b FSA*-katalysierte Reaktionen von Aldehyden mit Hydroxy- bzw. Dihydroxyaceton

- a) **Reaktion in H_2O :** Zu einer wässrigen Lösung des Aldehyds (1 eq) wird eine wässrige Hydroxy- (HA) bzw. Dihydroxyacetonlösung (DHA, 3 eq pro Aldehydfunktionalität) gegeben. Die Lösung wird mit H_2O auf 10 mL Gesamtvolumen pro 1 mmol Edukt aufgefüllt, dann mit FSA* (15–20 mg pro 1 mmol Edukt, FSA^{wt} bei HA bzw. FSA^{A129S} bei DHA) versetzt und die Lösung auf pH 7.5 eingestellt.
- b) **Reaktion in 20%iger DMSO Lösung:** Zu einer 20%igen DMSO Lösung des Aldehyds (1 eq) wird eine wässrige Hydroxy- (HA) bzw. Dihydroxyacetonlösung (DHA, 3 eq pro Aldehydfunktionalität) gegeben. Die Lösung wird mit DMSO und H_2O auf 10 mL Gesamtvolumen pro 1 mmol Edukt aufgefüllt, sodass die Gesamtlösung einen Anteil von 20% DMSO enthält. Im Anschluss wird FSA* (15–20 mg pro 1 mmol Edukt, FSA^{wt} bei HA bzw. FSA^{A129S} bei DHA) zugegeben und die Lösung auf pH 7.5 eingestellt.

Die Reaktionsmischungen werden jeweils solange geschüttelt (200 rpm), bis kein Umsatz mehr mittels HPLC-Analyse detektiert werden kann. Zwischendurch wird der pH-Wert mittels pH-Meter kontrolliert und gegebenenfalls erneut auf pH 7.5 eingestellt.

AAV5 Testreaktionen zur DERA^{F200I}- bzw. FSA^{D6H}-katalysierten Umsetzung von linearen Dialdehyden mit Aceton

In ein Eppendorf-Gefäß (1.5 mL) wird der Aldehyd (500 mM, 100 μ L, 50 μ mol, 1 eq), Aceton-Lsg. (1 M, 150 μ L, 150 μ mol, 3 eq) und TEA-Puffer (1 M, 25 μ L, pH 7.5) gegeben und mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 500 μ L aufgefüllt. Dazu wird entweder DERA^{F200I} oder FSA^{D6H} (1.5 mg) zugegeben und die Lösung auf pH 7.5 eingestellt. Die Reaktionsmischung wird solange geschüttelt, bis kein Umsatz mehr mittels HPLC-Analyse detektiert werden kann, wobei der Reaktionsverlauf sukzessive mittels DC und HPLC kontrolliert wird.

AAV6 Testreaktionen zur DERA*- und FSA*-katalysierten Umsetzung von BSA (59) mit Acetonderivaten

In ein Eppendorf-Gefäß (1.5 mL) wird BSA (59, 1 M, 50 μ L, 50 μ mol, 1 eq), eine wässrige Lösung des Aldol-Donors (500 mM, 300 μ L, 150 μ mol, 3 eq), sowie TEA-Puffer (1 M, 25 μ L, pH 7.5) gegeben und mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 500 μ L aufgefüllt. Im Anschluss wird der Katalysator (DERA- oder FSA-Variante, 1.5 mg) zugefügt und die Lösung auf pH 7.5 eingestellt. Die Reaktionsmischung wird solange geschüttelt, bis kein Umsatz mehr mittels HPLC-Analyse detektiert werden kann, wobei der Reaktionsfortschritt sukzessive mittels DC und HPLC kontrolliert wird.

AAV7 DERA*-katalysierte Reaktionen von BSA (59) mit Acetaldehyd

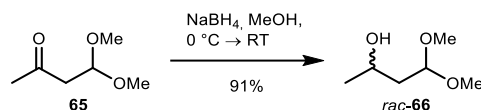
Die Synthese erfolgte in Anlehnung an WONG *et al.*^[63]

Zu einer wässrigen Lösung von BSA (**59**, 1.00 eq) wird eine wässrige Acetaldehydlösung¹¹ (3.00 eq) gegeben. Die Lösung kann mit Pufferlösung versetzt werden und wird anschließend auf 10 mL Gesamtvolumen pro 1 mmol Edukt mit H₂O aufgefüllt. Im Anschluss wird DERA* (15 mg pro 1 mmol Edukt) zugegeben und die Lösung auf pH 7.5 eingestellt. Die Reaktionsmischung wird solange bei Raumtemperatur gerührt, bis BSA (**59**) aufgebraucht ist. Falls die Konzentration an Acetaldehyd zu gering wird, wird dieses als Reinsubstanz nachträglich zugegeben. Der pH-Wert wird zwischendurch mittels pH-Meter kontrolliert und gegebenenfalls erneut auf pH 7.5 eingestellt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Aceton oder Methanol beendet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wird lyophilisiert und anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (EE/MeOH 6:1 → 1:1).

5.4 Synthesevorschriften

5.4.1 Versuche zu Kapitel 3.1.2

rac-4,4-Dimethoxybutan-2-ol (*rac*-**66**)

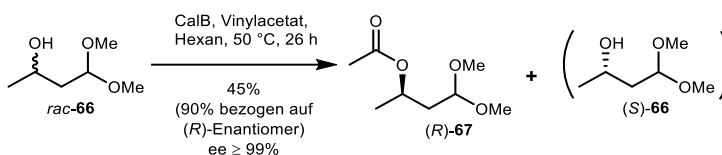


Synthese nach PURDER *et al.*^[143]

4,4-Dimethoxybutanon (**65**, 20.0 g, 151.0 mmol, 1.0 eq) wurde in MeOH (300 mL) gegeben und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde Natriumborhydrid (14.4 g, 381.0 mmol, 2.5 eq) portionsweise über 1.5 h zugegeben und im Anschluss 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in H₂O (200 mL) aufgenommen. Die wässrige Lösung wurde dreimal mit Et₂O (je 160 mL) extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, wobei *rac*-**66** als gelbliches Öl erhalten wurde (18.4 g, 137.0 mmol, 91%).

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.87 (SiO₂, CH/EE 1:2, Anisaldehyd); R_f = 0.05 (SiO₂, CH/EE 4:1, Anisaldehyd).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** δ = 4.55 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, *H*-4), 4.01–3.89 (m, 1H, *H*-2), 3.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 6H, 2x OCH₃), 1.81–1.62 (m, 2H, *H*-3), 1.17 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, *H*-1) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** δ = 104.1 (C-4), 64.8 (C-2), 53.9 (OCH₃), 53.0 (OCH₃), 41.1 (C-3), 23.5 (C-1) ppm.

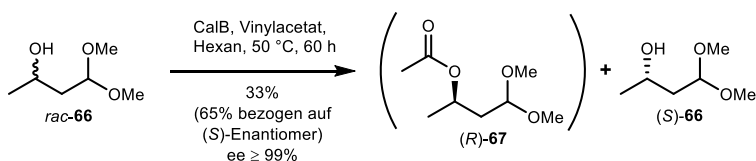
¹¹ Acetaldehyd wird vor der Verwendung frisch destilliert.

(R)-4,4-Dimethoxybutan-2-ylacetat ((R)-67)

Synthese nach PURDER *et al.*^[143]

rac-4,4-Dimethoxybutan-2-ol (*rac*-**66**, 3.80 g, 28.5 mmol, 1.00 eq), Vinylacetat (4.90 mL, 57.0 mmol, 2.00 eq) und CalB (0.95 g, immobilisiert) wurden in Hexan (100 mL) gegeben und mit Molekularsieb (3Å, 0.5 g, Pulver) versetzt. Der Reaktionsverlauf wurde gaschromatographisch kontrolliert und die Reaktion nach 26 h bei 50 °C, durch Abfiltrieren von CalB, beendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 4:1 → EE) aufgereinigt, wobei der Ester (*R*)-**67** als gelbliches Öl und der (*S*)-angereicherte Alkohol (*S*)-**66** als gelbliche Flüssigkeit erhalten wurden ((*R*)-**67**: 2.24 g, 12.7 mmol, 45%, 90% bezogen auf (*R*)-Enantiomer und (*S*)-**66**: 1.53 g, 11.4 mmol, 40%, 80% bezogen auf (*S*)-Enantiomer). Der (*S*)-angereicherte Alkohol (*S*)-**66** kann unter den gleichen Reaktionsbedingungen erneut umgesetzt werden, um den Enantiomerenüberschuss zu erhöhen.

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f ((*R*)-**67**) = 0.68 (SiO₂, CH/EE 1:5, Anisaldehyd), R_f ((*R*)-**67**) = 0.27 (SiO₂, CH/EE 4:1, Anisaldehyd).
- **Enantiomerenüberschuss:** $ee \geq 99\%$.
- **Gaschromatographie:** t_R ((*R*)-**67**) = 10.7 min, t_R ((*S*)-**66**) = 15.6 min.
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** δ = 5.08–4.94 (m, 1H, *H*-2), 4.43 (dd, J = 6.5, 5.0 Hz, 1H, *H*-4), 3.31 (d, J = 1.7 Hz, 6H, 2x OCH₃), 2.02 (d, J = 0.5 Hz, 3H, CH₃CO₂), 1.98–1.70 (m, 2H, *H*-3), 1.24 (d, J = 6.3 Hz, 3H, *H*-1) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** δ = 170.6 (CH₃CO₂), 101.9 (C-4), 68.0 (C-2), 53.4 (OCH₃), 52.6 (OCH₃), 39.2 (C-3), 21.4 (CH₃CO₂), 20.5 (C-1) ppm.

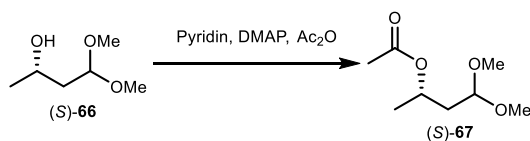
(S)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol ((S)-66)

Synthese nach PURDER *et al.*^[143]

4,4-Dimethoxybutan-2-ol (*rac*-**66**, 30.1 g, 224.0 mmol, 1.0 eq), Vinylacetat (41.4 mL, 448.0 mmol, 2.00 eq) und CalB (10.2 g, immobilisiert) wurden in Hexan (750 mL) gegeben und mit Molekularsieb (3Å, 2.5 g, Pulver) versetzt. Der Reaktionsverlauf wurde gaschromatographisch kontrolliert und nach 60 h bei 50 °C die Reaktion durch Abfiltrieren von CalB beendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 4:1 → EE) aufgereinigt, wobei der (*S*)-Alkohol (*S*)-**66** als gelbliche Flüssigkeit erhalten wurde (9.8 g, 73.0 mmol, 65% bezogen auf (*S*)-Enantiomer).

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.87 ((*R*)-**67**, SiO₂, CH/EE 1:5, Anisaldehyd); R_f = 0.42 ((*S*)-**66**, SiO₂, CH/EE 1:5, Anisaldehyd).

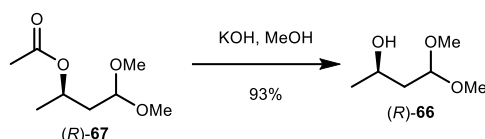
Die NMR-Daten stimmen mit von *rac*-4,4-Dimethoxybutan-2-ol (*rac*-**66**) bestimmten Daten überein.

Probenpräparation von (S)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol ((S)-66) für die GC

Synthese nach PURDER *et al.*^[143]

Um den Enantiomerenüberschuss von (S)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol ((S)-66) zu messen, wurde dessen freie Hydroxygruppe nach PURDER acyliert.^[143] Eine Probe des Alkohols ((S)-66, 10.0 μL , 73 μmol , 1.0 eq) wurde in 5 mL DCM gelöst, mit Pyridin (8.9 μL , 110 μmol , 1.5 eq) und 4-Dimethylaminopyridin (1.8 μg , 15 μmol , 0.2 eq) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Essigsäureanhydrid (13.8 μL , 146 μmol , 2.0 eq) zugegeben und die Reaktionsmischung 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde H₂O (5 mL) zugegeben und fünfmal mit Et₂O (je 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die Probe mittels GC gemessen.

- **Gaschromatographie:** $t_R = 15.4$ min.
- **Enantiomerenüberschuss:** $ee \geq 99\%$.

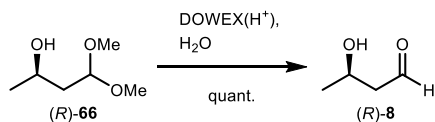
(R)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol ((R)-66)

Synthese nach PURDER *et al.*^[143]

Zu einer Lösung von (R)-4,4-Dimethoxybutan-2-ylacetat ((R)-67, 1.53 g, 8.7 mmol, 1.0 eq) in MeOH (50 mL) wurde Kaliumhydroxid (3.26 g, 58.1 mmol, 6.7 eq) gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mit HCl (konz.) neutralisiert und die wässrige Lösung fünfmal mit Et₂O (je 30 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, wobei (R)-66 als gelbliche Flüssigkeit erhalten wurde (1.08 g, 6.1 mmol, 93%).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.05$ (SiO₂, CH/EE 4:1, Anisaldehyd).

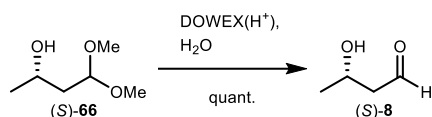
Die NMR-Daten stimmen mit von *rac*-4,4-Dimethoxybutan-2-ol (*rac*-66) bestimmten Daten überein.

(R)-3-Hydroxybutanal ((R)-8)

Synthese nach PURDER *et al.*^[143]

(R)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol ((R)-66, 1.04 g, 7.8 mmol, 1.0 eq) wurde in H₂O (15.5 mL) gelöst und mit DOWEX®(H⁺) (105 mg) versetzt. Die Suspension wurde 22 h bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und die Lösung bei 40 °C (200 mbar) auf etwa 10 mL Volumen eingeeengt. Die Lösung wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 15.5 mL aufgefüllt, sodass eine 500 mM konzentrierte Lösung von (R)-8 erhalten wurde.

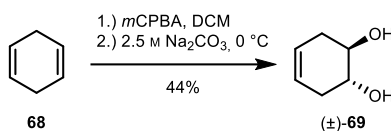
- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.31$ (SiO₂, CH/EE 1:5, Anisaldehyd).
- **HPLC:** $t_{R,(E)} = 13.5$ min, $t_{R,(Z)} = 13.7$ min (Isomere des derivatisierten Substrats).

(S)-3-Hydroxybutanal ((S)-8)

Synthese nach PURDER *et al.*^[143]

(S)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol ((S)-66, 6.7 g, 49.9 mmol, 1.0 eq) wurde in H₂O (100 mL) gelöst und mit DOWEX®(H⁺) (700 mg) versetzt. Die Suspension wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und die Lösung im Vakuum bei 40 °C (200 mbar) auf etwa 50 mL Gesamtvolumen eingengt. Die Lösung wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 mL aufgefüllt, sodass eine 500 mM konzentrierte Lösung von (S)-8 erhalten wurde.

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.31 (SiO₂, CH/EE 1:5, Anisaldehyd).
- **HPLC:** t_{R,(E)} = 13.5 min, t_{R,(Z)} = 13.7 min (Isomere des derivatisierten Substrats).

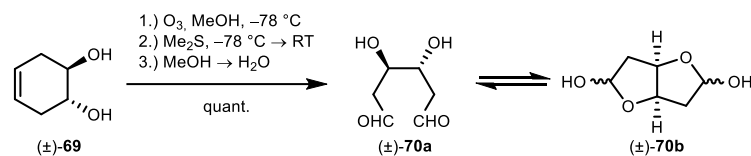
(±)-(1R,2R)-Cyclohex-4-en-1,2-diol ((±)-69)

Synthese nach MICHAUD *et al.*^[144] bzw. SUEMUNE *et al.*^[145]

Zu einer Lösung von Cyclohexa-1,4-dien (**68**, 8.41 g, 105.0 mmol, 1.0 eq) in DCM (10 mL) wurde unter Eiskühlung über einen Tropftrichter *m*CPBA (70–75% in Wasser, 27.1 g, 110.0 mmol, 1.1 eq) in DCM (200 mL) über 60 min zugetropft und das Reaktionsgemisch anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde anschließend auf 0 °C gekühlt, mit einer Na₂CO₃-Lsg. (2.5 M, 105 mL) versetzt und 15 min bei 0 °C gerührt. Die organische Phase wurde separiert und die wässrige Phase dreimal mit DCM (je 100 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt einmal mit H₂O (50 mL) und zweimal mit ges. NaCl-Lsg. (je 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum bei 40 °C (800 mbar) eingengt. Der Rückstand wurde mit einer Na₂CO₃-Lsg. (0.2 M, 105 mL) versetzt und für 48 h auf 95 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung mit einer HCl-Lsg. (2 M) auf pH 4 eingestellt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:1) aufgereinigt, wobei (±)-**69** als farbloser kristalliner Feststoff erhalten wurde (5.26 g, 46.0 mmol, 44%).

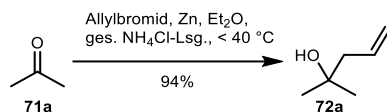
- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.54 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **Schmelzbereich:** Smp. = 95–98 °C (Smp._{Lit.}^[145] = 95 °C).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃/Methanol-d₄¹² 10:1):** δ = 5.54–5.46 (m, 2H, H-3, H-4), 4.63 (s, 2H, 2x OH), 3.61 (ddd, J = 7.2, 3.6, 1.8 Hz, 2H, H-1, H-6), 2.49–2.36 (m, 2H, H-2a, H-5a), 2.07–1.95 (m, 2H, H-2b, H-5b) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃/Methanol-d₄ 10:1):** δ = 125.0 (C-3, C-4), 72.1 (C-1, C-6), 33.7 (C-2, C-5) ppm.

¹² Normiert auf Methanol-d₄.

(±)-(3*R*,4*R*)-3,4-Dihydroxyhexandial ((±)-70)Synthese nach **AAV2a****Ansatz:**

- (±)-(1*R*,2*R*)-Cyclohex-4-en-1,2-diol ((±)-**69**, 571 mg 5.00 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 30 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{50 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{3.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (460 µL, 6.25 mmol, 1.25 eq)
- Konzentration auf c ≈ 500 mm eingestellt

5.4.2 Versuche zu Kapitel 3.1.3

2-Methyl-4-penten-2-ol (72a)Synthese nach **AAV1****Ansatz:**

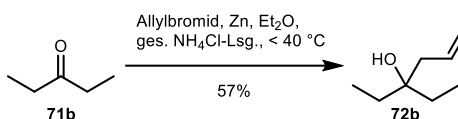
- Aceton (**71a**, 36.8 mL, 0.50 mol, 1.00 eq)
- Allylbromid (108 mL, 1.25 mol, 2.50 eq)
- Zinkpulver (65.4 g, 1.00 mol, 2.00 eq)
- ges. NH₄Cl-Lsg. (500 mL)
- Et₂O (150 mL)

Aufreinigung:

- Die Reaktionsmischung wurde fraktionierend destilliert, wobei **72a** als farblose Flüssigkeit erhalten wurde (46.8 g, 0.47 mol, 94%).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.38 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **Siedebereich:** Sdp. = 55 °C (75 mbar).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** δ = 5.85 (ddt, *J* = 16.8, 10.4, 7.5 Hz, 1H, *H*-4), 5.16–5.07 (m, 2H, *H*-5), 2.24 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, *H*-3), 2.17 (s, 6H, OH), 1.24 (s, 6H, *H*-1, *H*-1') ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** δ = 134.1 (*C*-4), 118.9 (*C*-5), 71.9 (*C*-2), 48.2 (*C*-3), 29.0 (*C*-1, *C*-1') ppm.

3-Ethyl-5-hexen-3-ol (72b)Synthese nach **AAV1****Ansatz:**

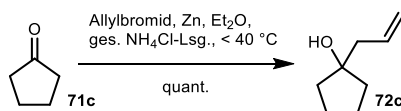
- 3-Pentanon (**71b**, 51 mL, 483.0 mmol, 1.0 eq)
- Allylbromid (105 mL, 1.21 mol, 2.5 eq)
- Zinkpulver (63.4 g, 0.97 mol, 2.0 eq)
- ges. NH₄Cl-Lsg. (500 mL)
- Et₂O (150 mL)

Aufreinigung:

- Die Reaktionsmischung wurde fraktionierend destilliert, wobei **72b** als farblose Flüssigkeit erhalten wurde (24.1 g, 280.0 mmol, 57% bezogen auf 126.0 mmol zurückgewonnenem Edukt).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.77$ (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **Siedebereich:** Sdp. = 62 °C (24 mbar).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** $\delta = 5.84$ (ddt, $J = 16.2, 11.0, 7.4$ Hz, 1H, *H*-5), 5.15–5.07 (m, 2H, *H*-6), 2.21–2.18 (m, 2H, *H*-4), 1.46 (q, $J = 7.4$ Hz, 4H, *H*-1', *H*-2), 1.34 (bs, 1H, OH), 0.87 (t, $J = 7.5$ Hz, 6H, *H*-1, *H*-2') ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** $\delta = 134.1$ (*C*-5), 118.5 (*C*-6), 74.3 (*C*-3), 43.0 (*C*-4), 31.1 (*C*-1', *C*-2), 7.9 (*C*-1, *C*-2') ppm.

1-(2-Propen-1-yl)-cyclopentanol (72c)Synthese nach **AAV1****Ansatz:**

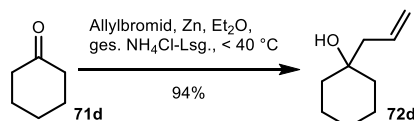
- Cyclopentanon (**71c**, 44.3 mL, 500.0 mmol, 1.0 eq)
- Allylbromid (108 mL, 1.25 mol, 2.5 eq)
- Zinkpulver (65.4 g, 1.00 mol, 2.0 eq)
- ges. NH₄Cl-Lsg. (500 mL)
- 150 mL Et₂O

Aufreinigung:

- Die Reaktionsmischung wurde fraktionierend destilliert, wobei **72c** als farblose Flüssigkeit erhalten wurde (26.5 g, 210.0 mmol, quantitativ bezogen auf 290.0 mmol zurückgewonnenem Edukt).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.50$ (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **Siedebereich:** Sdp. = 61 °C (9 mbar).
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3):** $\delta = 5.89$ (ddt, $J = 17.1, 9.5, 7.5$ Hz, 1H, $H-2'$), 5.19–5.11 (m, 2H, $H-3'$), 2.38 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, $H-1'$), 2.20 (bs, 1H, OH), 1.87–1.57 (m, 8H, $H-2, H-3, H-4, H-5$) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3):** $\delta = 134.4$ (C-2'), 119.0 (C-3'), 83.2 (C-1), 45.7 (C-1'), 39.4 (C-2, C-5), 24.0 (C-3, C-4) ppm.

1-(2-Propen-1-yl)-cyclohexanol (72d)Synthese nach **AAV1****Ansatz:**

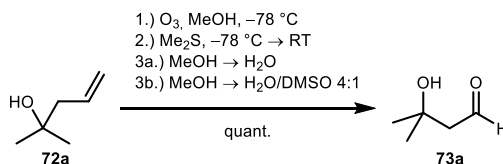
- Cyclohexanon (**71d**, 49.0 mL, 500.0 mmol, 1.0 eq)
- Allylbromid (108 mL, 1.25 mol, 2.5 eq)
- Zinkpulver (81.7 g, 1.25 mol, 2.5 eq)
- ges. NH_4Cl -Lsg. (500 mL)
- Et_2O (150 mL)

Aufreinigung:

- Das Lösungsmittel wurde im Vakuum bei 25 °C (8 mbar) entfernt, wobei **72d** als farblose Flüssigkeit erhalten wurde (66.0 g, 471.0 mmol, 94%).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.44$ (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3):** $\delta = 5.88$ (ddt, $J = 17.6, 10.3, 7.5$ Hz, 1H, $H-2'$), 5.16–5.06 (m, 2H, $H-3'$), 2.24–2.19 (m, 2H, $H-1'$), 1.65–1.17 (m, 11H, OH, $H-2, H-3, H-4, H-5, H-6$) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3):** $\delta = 133.8$ (C-2'), 118.8 (C-3'), 71.2 (C-1), 46.8 (C-1'), 37.5 (C-2, C-6), 25.9 (C-4), 22.3 (C-3, C-5) ppm.

3-Hydroxy-3-methyl-butanal (73a)Synthese nach **AAV2a****Ansatz:**

- 2-Methyl-4-penten-2-ol (**72a**, 501 mg, 5.00 mmol, 1.00 eq)

- MeOH (abs., 30 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{100 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{5.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (460 µL, 6.25 mmol, 1.25 eq)
- Konzentration auf c ≈ 500 mM eingestellt

Synthese nach **AAV2b**

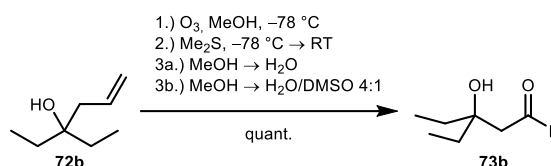
Ansatz:

- 2-Methyl-4-penten-2-ol (**72a**, 501 mg, 5.00 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 30 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{50 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{3.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (460 µL, 6.25 mmol, 1.25 eq)
- Konzentration auf c ≈ 500 mM eingestellt

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.14 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd, DNPH, Seebach).
- **HPLC:** t_{R,(E)} = 14.7 min, t_{R,(Z)} = 15.2 min (Isomere des derivatisierten Substrats).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, Methanol-d₄):**¹³ δ = 9.74 (t, J = 2.9 Hz, 1H, CHO), 2.73 (d, J = 2.9 Hz, 2H, H-3), 1.53 (s, 6H, H-1, H-1') ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, Methanol-d₄):** δ = 204.4 (CHO), 70.0 (C-2), 57.0 (C-3), 30.0 (C-1, C-1') ppm.

3-Ethyl-3-hydroxy-pentanal (73b)



Synthese nach **AAV2a**

Ansatz:

- 3-Ethyl-5-hexen-3-ol (**72b**, 641 mg, 5.00 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 30 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{100 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{5.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (460 µL, 6.25 mmol, 1.25 eq)
- Konzentration auf c ≈ 500 mM eingestellt

Synthese nach **AAV2b**

Ansatz:

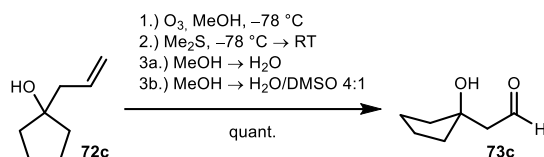
- 3-Ethyl-5-hexen-3-ol (**72b**, 641 mg 5.00 mmol, 1.00 eq)

¹³ Für die NMR-Spektren wurde die Reaktion in Methanol-d₄ durchgeführt. Im Spektrum sind einige Verunreinigungen zu erkennen, jedoch nur ein Aldehydsignal.

- MeOH (abs., 30 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{50 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{3.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (460 µL, 6.25 mmol, 1.25 eq)
- Konzentration auf c ≈ 500 mM eingestellt

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.27 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd, DNPH, Seebach).
- **HPLC:** t_{R,(E)} = 18.6 min, t_{R,(Z)} = 19.7 min (Isomere des derivatisierten Substrats).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, Methanol-d₄):**¹⁴ δ = 9.84 (t, J = 3.0 Hz, 1H, CHO), 2.61 (d, J = 3.0 Hz, 2H, H-4), 1.69–1.52 (m, J = 7.5 Hz, 4H, H-2, H-1'), 0.94 (t, J = 7.5 Hz, 6H, H-1, H-2') ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, Methanol-d₄):** δ = 204.9 (CHO), 75.0 (C-3), 55.8 (C-4), 31.2 (C-2, C-1'), 8.0 (C-1, C-2') ppm.

1-Hydroxy-cyclopentanacetaldehyd (73c)Synthese nach **AAV2a****Ansatz:**

- 1-(2-Propen-1-yl)-cyclopentanol (**72c**, 631 mg, 5.00 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 30 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{50 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{3.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (460 µL, 6.25 mmol, 1.25 eq)
- Konzentration auf c ≈ 500 mM eingestellt

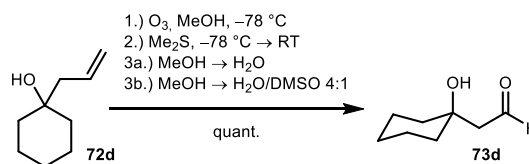
Synthese nach **AAV2b****Ansatz:**

- 1-(2-Propen-1-yl)-cyclopentanol (**72c**, 631 mg, 5.00 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 30 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{50 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{3.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (460 µL, 6.25 mmol, 1.25 eq)
- Konzentration auf c ≈ 250 mM eingestellt

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.20 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd, DNPH, Seebach).
- **HPLC:** t_{R,(E)} = 17.7 min, t_{R,(Z)} = 18.1 min (Isomere des derivatisierten Substrats).

¹⁴ Siehe Fußnote 13, Seite 143

1-Hydroxy-cyclohexanacetaldehyd (73d)Synthese nach **AAV2a****Ansatz:**

- 1-(2-Propen-1-yl)-cyclopentanol (**72d**, 701 mg, 5.00 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 30 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{50 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{3.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (460 µL, 6.25 mmol, 1.25 eq)
- Konzentration auf c ≈ 500 mM eingestellt

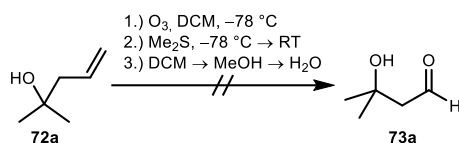
Synthese nach **AAV2b****Ansatz:**

- 1-(2-Propen-1-yl)-cyclopentanol (**72d**, 701 mg, 5.00 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 30 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{50 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{3.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (460 µL, 6.25 mmol, 1.25 eq)
- Konzentration auf c ≈ 250 mM eingestellt

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.22 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd, DNPH, Seebach).
- **HPLC:** t_{R,(E)} = 19.5 min, t_{R,(Z)} = 20.0 min (Isomere des derivatisierten Substrats).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O):**¹⁵ Aldehyd: δ = 9.83 (t, J = 3.1 Hz, 1H, CHO), 2.59 (d, J = 3.1 Hz, 2H, H-1'), 1.83–1.29 (m, 8H, H-2 bis H-6) ppm, Hydrat: δ = 4.85 (t, J = 5.4 Hz, 1H, CH(OH)₂), 1.83–1.29 (m, 10H, H-1', H-2 bis H-6) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, D₂O):** Aldehyd: δ = 206.6 (CHO), 71.2 (C-1), 54.4 (C-1'), 37.5 (C-2, C-6), 25.4 (C-4), 21.9 (C-3, C-5) ppm, Hydrat: δ = 89.6 (CH(OH)₂), 70.6 (C-1), 53.7 (C-1'), 37.2 (C-2, C-6), 25.1 (C-4), 21.7 (C-3, C-5) ppm.

¹⁵ Für die NMR-Spektren wurde die Reaktion in Methanol durchgeführt und im Anschluss das Lösungsmittel zu D₂O gewechselt. Im Spektrum sind einige Verunreinigungen zu erkennen, jedoch nur ein Aldehydsignal.

3-Hydroxy-3-methyl-butanal (73a)

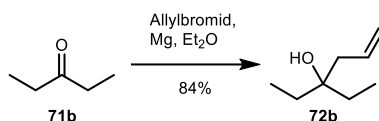
Synthese nach **AAV2a**, hier DCM als Lösungsmittel verwendet.

Ansatz:

- 2-Methyl-4-penten-2-ol (**72a**, 501 mg, 5.00 mmol, 1.00 eq)
- DCM (abs., 30 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{50 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{3.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (460 µL, 6.25 mmol, 1.25 eq)

Aufreinigung:

- DCM wurde zuerst gegen MeOH und dieses im Anschluss gegen H₂O ausgetauscht, wobei beim Konzentrieren der DCM-Lösung ein Großteil des Produkts ausfiel. Die neue Verbindung konnte mittels DC und HPLC nur in Spuren nachgewiesen wurden, sodass diese nicht weiter umgesetzt wurde.

3-Ethyl-5-hexen-3-ol (72b) durch Grignard-Reaktion

Anlehnung an BARTON *et al.*^[147]

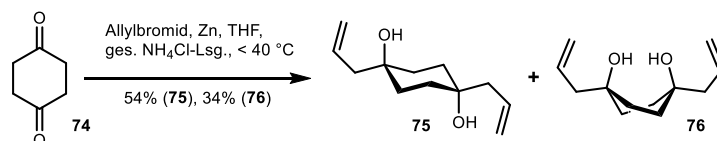
Magnesium (9.72 g, 400.0 mmol, 4.0 eq) wurde in Et₂O (abs., 100 mL) gegeben. Anschließend wurden 5 mL einer Lösung aus Allylbromid (17.3 mL, 200.0 mmol, 2.0 eq) in Et₂O (abs, 100 mL) zugetropft und solange gerührt, bis eine exotherme Reaktion eintrat. Die restliche Allylbromid-Lsg. wurde über 40 min so zugetropft, sodass die Reaktionsmischung gelinde siedete (externes Eisbad) und anschließend für 1 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, 3-Pentanone (**71b**, 10.6 mL, 100.0 mmol, 1.0 eq) in Et₂O (abs., 50 mL) zugetropft und für 1 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von eiskalter NH₃-Lsg. (aq, 2 M, 200 mL) beendet. Die organische Phase separiert und die wässrige Phase zweimal mit Et₂O (je 200 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO₄ getrocknet und die Lösung bei 40 °C (700 mbar) mittels Rotationsverdampfer eingengt. Die noch verbliebenen Lösungsmittelreste, sowie Reste an Allylbromid wurden in einer Destillationsapparatur bei 45 °C (55 mbar) entfernt¹⁶, wobei **72b** als farblose Flüssigkeit erhalten wurde (10.77 g, 84.0 mmol, 84%).

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.56 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd).

¹⁶ Wird die Zielverbindung **72b** regulär unter Vakuum destilliert tritt häufig eine Eliminierung (zu 4-Ethylhexa-1,3-dien) ein. Das Eliminierungsprodukt wird folglich als Mischfraktion mit dem Zielprodukt **72b** erhalten, was die Reinheit sowie Ausbeute drastisch verringert.

- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3):** δ = 5.84 (ddt, J = 16.2, 11.0, 7.4 Hz, 1H, $H-5$), 5.15–5.07 (m, 2H, $H-6$), 2.21–2.18 (m, 2H, $H-4$), 1.46 (q, J = 7.4 Hz, 4H, $H-1'$, $H-2$), 1.34 (bs, 1H, OH), 0.87 (t, J = 7.5 Hz, 6H, $H-1$, $H-2'$) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3):** δ = 134.1 ($C-5$), 118.5 ($C-6$), 74.3 ($C-3$), 43.0 ($C-4$), 31.1 ($C-1'$, $C-2$), 7.9 ($C-1$, $C-2'$) ppm.

(1*r*,4*r*)-1,4-Diallylcyclohexan-1,4-diol (75**) und (1*s*,4*s*)-1,4-Diallylcyclohexan-1,4-diol (**76**)**

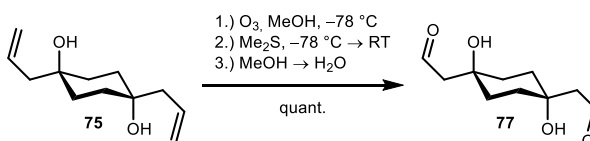


Anlehnung an MOSKALENKO *et al.*^[142]

Cyclohexan-1,4-dion (**74**, 5.00 g, 45.0 mmol, 1.0eq) und Zinkpulver (11.80 g, 180.0 mmol, 4.0 eq) wurden in eine Mischung aus THF (30 mL) und ges. NH_4Cl -Lsg (100 mL) gegeben. Zu der Suspension wurde Allylbromid (19.5 mL, 225.0 mmol, 5.0 eq) über 2 h langsam zugetropft, sodass die Innentemperatur nicht über 40 °C stieg (Eisbad). Die Suspension wurde filtriert, dreimal mit Et_2O (je 50 mL) und dreimal mit DCM (je 50 mL) gewaschen. Vom Filtrat wurde die organische Phase separiert und die wässrige Lösung dreimal mit DCM (je 150 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 4:1) aufgereinigt, wobei **75** und **76** jeweils als farbloser kristalliner Feststoff erhalten wurden (**75**: 4.88 g, 24.4 mmol, 54% und **76**: 3.04 g, 15.5 mmol, 34%).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f(\textbf{75})$ = 0.09 (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd, Seebach), $R_f(\textbf{76})$ = 0.47 (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd, Seebach).
- **Schmelzbereich:** Smp.(**75**) = 128–130 °C, Smp.(**76**) = 72–73 °C.
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3):** *trans*-Produkt (**75**): δ = 5.88 (ddt, J = 16.9, 10.3, 7.5 Hz, 2H, $H-2'$, $H-2''$), 5.19–5.05 (m, 4H, $H-3'$, $H-3''$), 2.21 (dt, J = 7.5, 1.2 Hz, 2H, $H-1'$, $H-1''$), 1.81–1.64 (m, 4H, $H-2_{\text{ax}}$, $H-3_{\text{ax}}$, $H-5_{\text{ax}}$, $H-6_{\text{ax}}$), 1.53–1.41 (m, 4H, $H-2_{\text{eq}}$, $H-3_{\text{eq}}$, $H-5_{\text{eq}}$, $H-6_{\text{eq}}$), 1.36 (s, 2x OH) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3):** *trans*-Produkt (**75**): δ = 133.6 ($C-2'$, $C-2''$), 119.2 ($C-3'$, $C-3''$), 70.4 ($C-1$, $C-4$), 48.2 ($C-2$, $C-3$, $C-5$, $C-6$), 32.5 ($C-1'$, $C-1''$) ppm.
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{Methanol-}d_4$ 10:1):** *cis*-Produkt (**76**): δ = 5.71 (ddt, J = 17.5, 10.3, 7.4 Hz, 2H, $H-2'$, $H-2''$), 5.00–4.87 (m, 4H, $H-3'$, $H-3''$), 2.05 (dt, J = 7.4, 1.2 Hz, 2H, $H-1'$, $H-1''$), 1.57–1.43 (m, 4H, CH_2), 1.39–1.25 (m, 4H, CH_2) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{Methanol-}d_4$ 10:1):** *cis*-Produkt (**76**): δ = 133.7 ($C-2'$, $C-2''$), 118.4 ($C-3'$, $C-3''$), 70.6 ($C-1$, $C-4$), 44.12 ($C-2$, $C-3$, $C-5$, $C-6$), 33.45 ($C-1'$, $C-1''$) ppm.

2,2'-((1*r*,4*r*)-1,4-Dihydroxycyclohexan-1,4-diyl)diacetaldehyd (77**)**



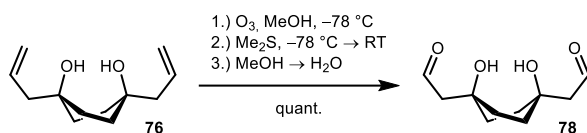
Synthese nach AAV2a

Ansatz:

- (1*s*,4*s*)-1,4-Diallylcyclohexan-1,4-diol (**75**, 186 mg, 1.0 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 30 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{100 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{5.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (150 µL, 2.0 mmol, 2.00 eq)
- Konzentration auf c ≈ 500 mm eingestellt

Analytik:

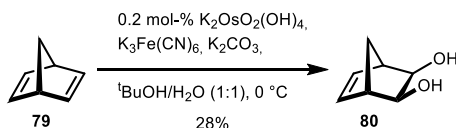
- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.68 (SiO₂, DCM/MeOH 5:1, Anisaldehyd).

2,2'-((1*s*,4*s*)-1,4-Dihydroxycyclohexan-1,4-diyl)diacetaldehyd (78**)**Synthese nach **AAV2a****Ansatz:**

- (1*s*,4*s*)-1,4-Diallylcyclohexan-1,4-diol (**76**, 589 mg, 3.0 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 30 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{100 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{5.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (440 µL, 6.0 mmol, 2.00 eq)
- Konzentration auf c ≈ 500 mm eingestellt

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.54 (SiO₂, DCM/MeOH 5:1, Anisaldehyd).

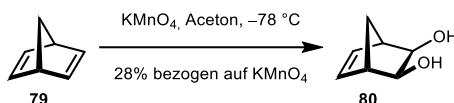
(1*R*,2*R*,3*S*,4*S*)-Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-diol (80**)**Dihydroxylierung nach SHARPLESS *et al.*^[148]

Norbornadien (**79**, 461 mg, 5.0 mmol, 1.00 eq), K₃Fe(CN)₆ (4.94 g, 15.0 mmol, 3.00 eq), K₂CO₃ (2.07 g, 15.0 mmol, 3.00 eq) und K₂OsO₂(OH)₄ (4 mg, 10 µmol, 0.2 mol-%) wurden in ^tBuOH/H₂O (1:1, 50 mL) suspendiert, auf 0 °C gekühlt (Kryostat) und für 3 d bei dieser Temperatur gerührt. Zum Beenden der Reaktion wurde Na₂SO₃ (7.50 g) zu der Suspension gegeben und für 30 min bei 25 °C gerührt. Die Mischung wurde über Celite® abfiltriert und mit EE (25 mL) gewaschen. Vom Filtrat wurde die organische Phase separiert und die wässrige Phase dreimal mit EE (je 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wobei **80** als schwach gelber kristalliner Feststoff

erhalten wurde (171 mg, 1.4 mmol, 28%¹⁷). Das Diol **80** wurde ohne weitere Aufreinigung weiter eingesetzt, wobei wahlweise eine säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel (CH/EE 2:1) durchgeführt werden kann.

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.32$ (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **Schmelzbereich:** Smp. = 100–104 °C (Smp._{Lit.}^[209] 100–104 °C).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl_3):** $\delta = 6.02$ (t, $J = 1.9$ Hz, 2H, *H*-5, *H*-6), 3.67 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H, *H*-2, *H*-3), 3.52 (s, 2H, 2x OH), 2.67 (t, $J = 1.8$ Hz, 2H, *H*-1, *H*-4), 1.86 (dt, $J = 9.2, 1.6$ Hz, 1H, CH_2), 1.60 (dt, $J = 9.2, 1.6$ Hz, 1H, CH_2) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl_3):** $\delta = 136.4$ (*C*-5, *C*-6), 68.9 (*C*-2, *C*-3), 48.0 (*C*-1, *C*-4), 42.3 (CH_2) ppm.

(1*R*,2*R*,3*S*,4*S*)-Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-diol (80**)**

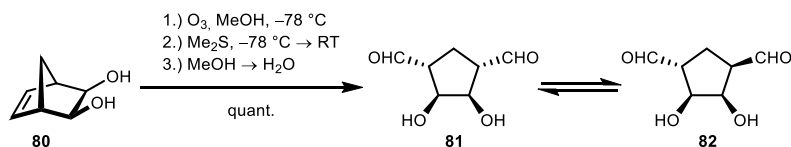


Synthese nach DISHINGTON *et al.*^[210]

Zu einer Lösung von Norbornadien (**79**, 21.19 g, 0.23 mol, 2.30 eq) in Aceton (220 mL) wurde bei -78°C Kaliumpermanganat (15.81 g, 0.10 mol, 1.00 eq) portionsweise über 10 min zugegeben und anschließend 2 h bei -78°C gerührt. Zu der Reaktionsmischung wurde eine Lösung von NaOH (4.00 g, 0.10 mol, 1.00 eq) und Na_2SO_3 (13.00 g, 0.10 mol, 1.00 eq) in H_2O (70 mL) über 5 min zugegeben. Das Kühlbad wurde entfernt und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Überstand wurde abdekantiert und der Rückstand sechsmal mit Aceton/ H_2O (9:1, je 100 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, im Vakuum eingeeengt und dreimal mit CHCl_3 (je 300 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 2:1) aufgereinigt, wobei **80** als schwach gelbe Kristallnadeln erhalten wurde (4.05 g, 0.03 mol, 30%).

Die analytischen Daten stimmen mit den bereits vorher gemessenen Daten überein.

(1*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-4,5-Dihydroxycyclopentan-1,3-dicarbaldehyd (82**)**



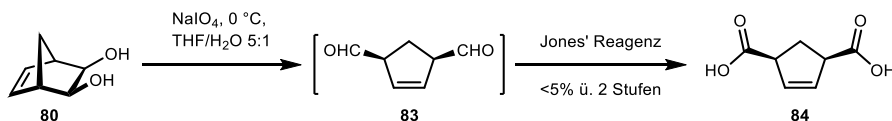
Synthese nach AAV2a

Ansatz:

- (1*R*,3*S*,4*S*)-Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-diol (**80**, 631 mg, 5.00 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 30 mL)

¹⁷ Wurden je 1.00 eq $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ und K_2CO_3 sowie 0.2 mol-% $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ eingesetzt, wurde eine Rohausbeute von 24% erzielt. Wurden je 0.50 eq $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ und K_2CO_3 sowie 0.1 mol-% $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ eingesetzt, wurde eine Rohausbeute von 25% erzielt.

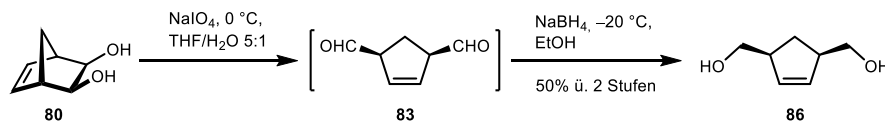
- O_3 (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{50 \text{ L } O_2}{h} \cong \frac{3.0 \text{ g } O_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me_2S (460 μL , 6.25 mmol, 1.25 eq)
- Konzentration auf $c \approx 500 \text{ mM}$ eingestellt

Cyclopent-4-en-1,3-dicarbonsäure (84)

Oxidation mit Natriumperiodat nach COOK *et al.*^[150]

Eine Lösung von (1*R*,3*S*,4*S*)-Bicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2,3-diol (**80**, 189 mg, 1.50 mmol, 1.00 eq) in THF/H₂O (5:1, 7 mL) wurde auf 0 °C gekühlt. Es wurde Natriumperiodat (449 mg, 2.10 mmol, 1.40 eq) zugegeben, 1 h bei 0 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zum Reaktionsgemisch wurde dann H₂O (5 mL) sowie EE (25 mL) zugegeben, die organische Phase wurde separiert und die wässrige Phase dreimal mit EE (je 25 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Aceton (10 mL) aufgenommen, auf 0 °C gekühlt, Jones'-Reagenz (1.16 M, 1.2 mL) zugetropft und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mit H₂O (5 mL) versetzt und dreimal mit EE (je 20 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in NaOH-Lsg. (2 M, 20 mL, pH 10) aufgenommen und noch zweimal mit EE (je 25 mL) gewaschen. Im Anschluss daran wurde die Lösung mittels HCl-Lsg. (2 M) auf pH 4.5 eingestellt und die wässrige Phase dreimal mit EE (je 25 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wobei **84** als gelb-brauner Feststoff erhalten wurde (11 mg¹⁸, 0.07 mmol, 5%).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.06$ (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃/Methanol-*d*₄):** $\delta = 5.85\text{--}5.71$ (m, 2H, *H*-4, *H*-5), 3.59–3.49 (m, 2H, *H*-1, *H*-3), 2.42–2.33 (m, 2H, *H*-2) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃/Methanol-*d*₄):** $\delta = 175.5$ (2x CO₂H), 130.5 (*C*-4, *C*-5), 49.4 (*C*-1, *C*-3), 28.5 (*C*-2) ppm.

(1*R*,3*S*)-Cyclopent-4-en-1,3-diöldimethanol (86)

Synthese nach COOK *et al.*^[150]

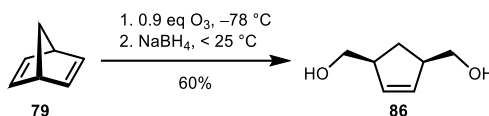
Eine Lösung von Diol (**80**, 378 mg, 3.0 mmol, 1.00 eq) in THF/H₂O (5:1, 14 mL) wurde auf 0 °C gekühlt, Natriumperiodat (898 mg, 4.2 mmol, 1.40 eq) zugegeben, 5 h bei 0 °C und anschließend weitere 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Zur Lösung wurde H₂O (10 mL) und EE (25 mL) gegeben und die organische Phase separiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EE (je 25 mL) extrahiert, die organischen Phasen vereinigt,

¹⁸ Es wurden 22 mg erhalten, welche zu etwa 50% das gewünschte Produkt enthalten. Dieses konnte NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden.

über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in EtOH (14 mL) gelöst und auf $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (Eis/Kochsalz 4:1) gekühlt. Zu der Lösung wurde Natriumborhydrid (318 mg, 8.4 mmol, 2.80 eq) zugegeben und 1.5 h bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von wenig NH_4Cl -Lsg. beendet bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. Die Reaktionslösung wurde dreimal mit EE (je 40 mL) extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 2:1 \rightarrow EE) aufgereinigt, wobei **86** als farbloses Öl erhalten wurde (193 mg, 1.5 mmol, 50% über 2 Stufen).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.35$ (SiO_2 , EE, Anisaldehyd).

(1R,3S)-Cyclopent-4-en-1,3-diylldimethanol (**86**) durch Ozonolyse

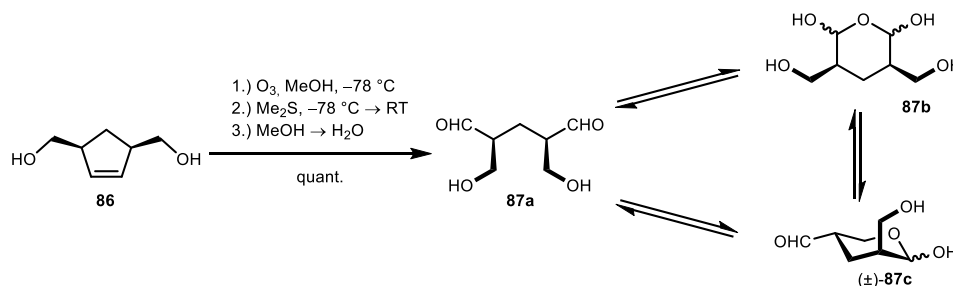


Synthese nach GROB *et al.*^[151]

Norbornadien (**79**, 9.20 g, 100.0 mmol, 1.0 eq) wurde in MeOH (120 mL) gelöst, auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und mit O_2 gesättigt. Im Anschluss wurde die Lösung mit O_3 (4.33 g, 90.0 mmol, 0.9 eq) mit einer Gasflussrate von $\frac{100 \text{ L } \text{O}_2}{\text{h}} \cong \frac{5.0 \text{ g } \text{O}_3}{\text{h}}$ bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ für 53 min durchspült. Danach wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und portionsweise Natriumborhydrid (4.92 g, 130.0 mmol, 1.3 eq), sodass die Temperatur $25\text{ }^\circ\text{C}$ nicht überstieg. Die Reaktionslösung wurde für weitere 30 min bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt, mit H_2O (30 mL) versetzt und auf ca. 20 mL Volumen im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde filtriert, einmal mit H_2O (10 mL) gewaschen und die Lösung mit K_2CO_3 gesättigt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EE (je 50 mL) extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, wobei **86** als gelbliches Öl erhalten wurde (7.68 g, 60.0 mmol, 60%), welches von ausreichender Reinheit¹⁹ war und wie erhalten in der Folgereaktion eingesetzt wurde.

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.25$ (SiO_2 , EE, Anisaldehyd).
- **Siedebereich:** Sdp. = $114\text{ }^\circ\text{C}$ (0.45 mbar) (Sdp._{Lit.}^[151] = $91\text{--}93\text{ }^\circ\text{C}$ (0.08 mbar)).
- **^1H -NMR (300.1 MHz, CDCl_3):** $\delta = 5.71$ (s, H -4, H -5), 3.60 (dd, $J = 4.6, 2.6$ Hz, 4H, 2x CH_2OH), 3.12 (s, 2H, OH), 2.96–2.87 (m, 2H, H -1, H -3), 2.21 (dt, $J = 13.6, 9.5$ Hz, 1H, H -2a), 1.44 (dt, $J = 13.6, 5.4$ Hz, 1H, H -2b) ppm.
- **^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3):** $\delta = 133.7$ (C-4, C-5), 66.2 (2x CH_2OH), 48.2 (C-1, C-3), 28.8 (C-2) ppm.

(2R,4S)-2,4-bis(hydroxymethyl)pentandial (**87**)

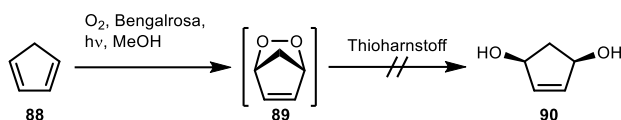


¹⁹ Eine geringe Verbesserung der Reinheit konnte zusätzlich durch Vakuumdestillation erreicht werden.

Synthese nach AAV2a

Ansatz:

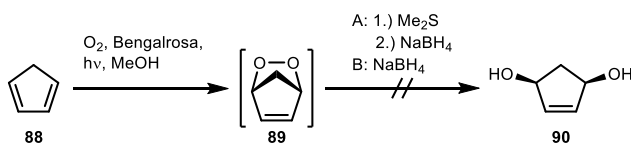
- (1*R*,3*S*)-Cyclopent-4-en-1,3-diylidimethanol (**86**, 775 mg, 6.05 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 36 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{50 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{3.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (550 µL, 7.56 mmol, 1.25 eq)
- Konzentration auf c ≈ 500 mM eingestellt

(1*R*,3*S*)-Cyclopent-4-en-1,3-diol (**90**)

Anlehnung an CHEN *et al.* ^[153]

Cyclopentadien (**88**, 1.60 g, 24.2 mmol, 1.00 eq, vorher bei 200 °C gecrackt und durch Destillation gereinigt) wurde in MeOH (abs., 500 mL) gelöst und dazu Bengalrosa (50 mg) sowie Thioharnstoff (1.84 g, 16.4 mmol, 1.50 eq) gegeben. Die Lösung wurde für 3 h bei einer internen Kühlung auf 25 °C mit O₂ durchspült ($50 \frac{\text{L O}_2}{h}$) und mit einer UV-Lampe bestrahlt (Hochdruck Quecksilberlampe). Nach 2 h wurde erneut Bengalrosa zugegeben (50 mg) und die Reaktion über Nacht weiter durchgeführt. Nach Beenden der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie an Kieselgel aufgereinigt (CH/EE 2:1), wobei **90** in keiner der isolierten Fraktionen nachgewiesen werden konnte.

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f(**89**) = 0.30 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd), R_f(**90**) = 0.08 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd).

(1*R*,3*S*)-Cyclopent-4-en-1,3-diol (**90**)

Anlehnung an CHEN *et al.* ^[153]

Cyclopentadien (**88**, 1.65 g, 25.0 mmol, 1.00 eq, vorher bei 200 °C gecrackt und durch Destillation gereinigt) wurde in MeOH (abs., 150 mL) gelöst und dazu Bengalrosa (50 mg) gegeben. Die Lösung wurde für 3 h bei einer internen Kühlung auf 25 °C mit O₂ durchspült ($50 \frac{\text{L O}_2}{h}$) und mit einer UV-Lampe bestrahlt (Hochdruck Quecksilberlampe). Nach 1 h wurde erneut Bengalrosa zugegeben (50 mg). Die Lösung wurde in etwa zwei gleiche Portionen (Lösung A und B) aufgeteilt.

A: Zu 60 mL Lösung (enthält **89**, 12.5 mmol, 1.00 eq) wurde Dimethylsulfid (1.14 mL, 15.6 mmol, 1.25 eq) bei 0 °C zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, wobei kein neuer Produktpot mittels Dünnschichtchromatographie zu erkennen ist. Das Dimethylsulfid wurde bei 40 °C (400 mbar) am Rotationsverdampfer entfernt und zu der Lösung wurde Natriumborhydrid (590 mg, 15.6 mmol, 1.25 eq) bei 0 °C portionsweise zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde im Anschluss

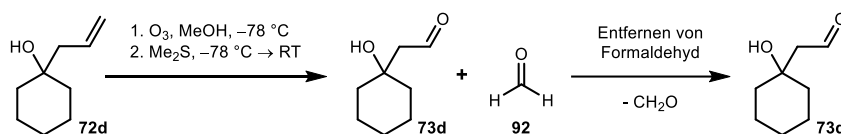
mit HCl-Lsg. (2 M) auf pH 5 eingestellt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:1) aufgereinigt, wobei **90** in keiner der isolierten Fraktionen nachgewiesen werden konnte.

B: Zu 60 mL Lösung (enthält **89**, 12.5 mmol, 1.00 eq) wurde Natriumborhydrid (590 mg, 15.6 mmol, 1.25 eq) portionsweise bei 0 °C zugegeben und 15 min gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:1) aufgereinigt, wobei **90** in keiner der isolierten Fraktionen nachgewiesen werden konnte.

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f(\mathbf{89}) = 0.30$ (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd), $R_f(\mathbf{90}) = 0.08$ (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd).

5.4.2.1 Versuche zu Kapitel 3.1.3.1

1-Allylcyclohexan-1-ol (**72d**) wurde mittels **AAV2a** umgesetzt und eine Lösung des Aldehyds (500 mM) in Methanol hergestellt.



Kryotransfer

Die Aldehydlösung (30 mL) wurde in einem 50 mL-Rundkolben vorgelegt. Der Rundkolben wurde mit einer Destillationsbrücke ausgestattet und am anderen Ende mit einem 50 mL-Schlenkrundkolben versehen. Unter den Vorlagekolben wurde ein Wasserbad gestellt und der Schlenkrundkolben auf -78°C gekühlt. Anschließend wurde ein statischer Unterdruck angelegt (Schließen des Hahns am Schlenkkolben), sodass das Lösungsmittel im Vorlagekolben gelinde siedete. Nach jeweils 60 min wurden HPLC-Proben entnommen.

Gefrier-/Tauzyklen

Die Aldehydlösung (30 mL) wurde in einem 50 mL-Schlenkrundkolben vorgelegt, die Reaktionslösung bei -78°C eingefroren und im dynamischen Vakuum (1–2 mbar) auftauen gelassen (etwa 10–15 min pro Zyklus). Nach jedem zweiten Zyklus wurden HPLC-Proben entnommen.

Co-Destillation mit Methanol²⁰

Die Aldehydlösung (60 mL) wurde in einem 100 mL-Rundhalskolben bei 25°C (30 mbar) [40°C (200 mbar)] über einen Zeitraum von 90–120 min [30–60 min] auf ein Volumen von 10–20 mL eingengt. Nach jedem Co-Destillationszyklus wurden HPLC-Proben entnommen. Es wurden insgesamt sechs Zyklen bei 25°C und zwölf Zyklen bei 40°C durchgeführt.

²⁰ Die angegebenen Parameter in eckigen Klammern beziehen sich auf eine Co-Destillation bei 40°C . Die Destillation erfolgte an einem Rotationsverdampfer.

Entgasen mit Argon

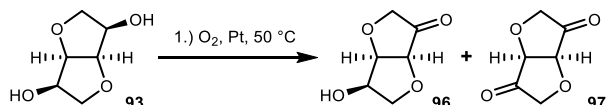
Die Aldehydlösung (30 mL) wurde in einen 100 mL-Zweihalsrundkolben mit Gaseinleitrohr gegeben und ein stetiger Argonstrom durch die Reaktionslösung geleitet. Alle 30 min wurden HPLC-Proben entnommen. Das Lösungsmittelvolumen sank in diesen Zeiträumen jeweils auf etwa 20–25 mL.

Probenpräparation (HPLC-Messungen)

Die Reaktionslösung wurde nach jedem Messzyklus auf das Anfangsvolumen mit Methanol aufgefüllt. Anschließend wurden Proben nach dem Protokoll zur Probenpräparation für HPLC-Messungen vorbereitet (Kapitel 5.1.3.4), wobei abweichend Hydroxyaceton-Lsg. (500 mM, 10 µL), als interner Standard, und 100 µL Derivatisierungsreagenz eingesetzt wurden.

5.4.3 Versuche zu Kapitel 3.1.4

(3a*S*,6*R*,6a*R*)-6-Hydroxytetrahydrofuro[3,2-*b*]furan-3(2*H*)-on (96) und 1,4:3,6-Dianhydro-D-*threo*-2,5-hexodiulose (97)



Synthese nach HEYNES *et al.*^[154]

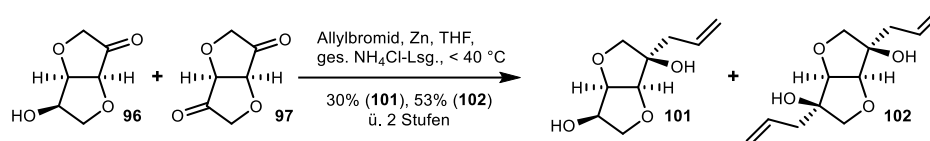
Platin(II)oxid-dihydrat (783 mg, 79–84% Platinanteil, entspricht etwa 2.7 mmol Platin) wurde unter H₂-Atmosphäre für 1 d gerührt (Exotherme Reaktion). Der Platinrückstand wurde in H₂O (75 mL) suspendiert. Zu der Suspension wurde 1,4:3,6-Dianhydro-D-mannitol (**93**, 2.92 g, 20.0 mmol) gegeben und die Lösung mit O₂ ($\frac{50 \text{ L O}_2}{\text{h}}$) bei 50 °C für 14.75 h durchströmt. Der Überstand der Lösung wurde im Anschluss abpipettiert und der Rückstand dreimal mit H₂O (je 50 mL) gewaschen und der Überstand jeweils abpipettiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden im Vakuum eingengt und lyophilisiert. Es wurde ein farbloser Kristallbrei erhalten (3.55 g), der wie erhalten in der Folgereaktion eingesetzt wurde.²¹

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f(**96**) = 0.66 (SiO₂, Tol/EtOH 10:1, Anisaldehyd, Seebach) (R_{f,Lit.}(**96**)^[154] = 0.58), R_f(**97**) = 0.75 (SiO₂, Tol/EtOH 10:1, Anisaldehyd, Seebach) (R_{f,Lit.}(**97**)^[154] = 0.70).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O):**²² Jeweils als Hydrat: δ = 4.64 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, *H*-4_χ), 4.40–4.31 (m, 1H, *H*-5_χ), 4.28 (s, 4H, *H*-3_ψ, *H*-4_ψ), 4.21 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, *H*-3_χ), 4.02 (dd, *J* = 8.9, 6.8 Hz, 1H, *H*-6a_χ), 3.83 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, *H*-1a_χ), 3.78 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H, *H*-1a_ψ, *H*-6a_ψ), 3.68 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, *H*-1b_χ), 3.65 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H, *H*-1b_ψ, *H*-6b_ψ), 3.54 (dd, *J* = 8.9, 8.8 Hz, 1H, *H*-6b_χ) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, D₂O):** Jeweils als Hydrat: δ = 101.1 (C-2_ψ, C-5_ψ), 101.2 (C-2_χ), 85.2 (C-3_ψ, C-4_ψ), 84.9 (C-3_χ), 82.1 (C-4_χ), 74.7 (C-1_χ), 74.3 (C-1_ψ, C-6_ψ), 72.0 (C-5_χ), 71.1 (C-6_χ) ppm.

²¹ Dünnschichtchromatographisch können die gebildeten Produkte unzureichend differenziert werden. Die NMR-Analyse weist das Vorhandensein des einfach und des zweifach oxidierten Produktes nach.

²² Die Signale des einfach oxidierten Produkts **96** sind mit Index χ und des zweifach oxidierten **97** mit ψ versehen.

(3*R*,3*aS*,6*R*,6*aR*)-3-Allylhexahydrofuro[3,2-*b*]furan-3,6-diol (101) und (3*R*,3*aS*,6*R*,6*aS*)-3,6-Diallylhexahydrofuro[3,2-*b*]furan-3,6-diol (102)



Synthese nach **AAV1**

Ansatz:

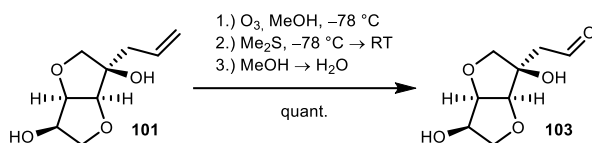
- Mischung aus **96** und **97** (3.55 g, max. 20.0 mmol, 1.0 eq)
- Allylbromid (15.6 mL, 180.0 mmol, 9.0 eq)
- Zinkpulver (9.42 g, 144.0 mmol, 7.2 eq)
- ges. NH₄Cl-Lsg. (20 mL)
- THF (5.5 mL)

Aufreinigung:

- Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 50:1) aufgereinigt, wobei **101** als farbloser Kristallbrei und **102** als farblose Kristallrosen erhalten wurden (**101**: 1.11 g, 6.0 mmol, 30% und **102**: 2.40 g, 10.6 mmol, 53%).

Analytik:

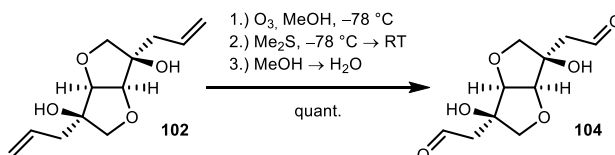
- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f(\mathbf{101}) = 0.56$ (SiO₂, DCM/MeOH 10:1, Anisaldehyd), $R_f(\mathbf{102}) = 0.69$ (SiO₂, DCM/MeOH 10:1, Anisaldehyd).
- **Schmelzbereich (102):** Smp. = 68–70 °C.
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃, 101):** $\delta = 5.94$ (ddt, $J = 16.3, 11.1, 7.2$ Hz, 1H, *H*-2'), 5.19–5.10 (m, 2H, *H*-3'), 4.46 (dd, $J = 4.9, 4.7$ Hz, 1H, *H*-5), 4.26 (ddd, $J = 7.5, 6.4, 5.1$ Hz, 1H, *H*-7a), 4.13 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, *H*-4), 3.95 (dd, $J = 8.8, 6.4$ Hz, 1H, *H*-7b), 3.76 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, *H*-2a), 3.64 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, *H*-6), 3.60 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, *H*-2b), 2.37–2.31 (m, 2H, *H*-1') ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, 101):** $\delta = 134.2$ (*C*-2'), 118.8 (*C*-3'), 86.6 (*C*-4), 83.3 (*C*-5), 80.8 (*C*-3), 77.1 (*C*-2), 73.9 (*C*-6), 73.8 (*C*-7), 42.3 (*C*-1') ppm.
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃, 102):** $\delta = 5.92$ (ddt, $J = 17.6, 9.6, 7.2$ Hz, 2H, *H*-2', *H*-2''), 5.18–5.09 (m, 4H, *H*-3', *H*-3''), 4.11 (s, 2H, *H*-4, *H*-5), 3.73 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, *H*-2a, *H*-7a), 3.61 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, *H*-2b, *H*-7b), 2.38–2.26 (m, 4H, *H*-1', *H*-1'') ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, 102):** $\delta = 134.2$ (*C*-2', *C*-2''), 118.8 (*C*-3', *C*-3''), 86.8 (*C*-4, *C*-5), 81.0 (*C*-3, *C*-6), 76.7 (*C*-2, *C*-7), 42.5 (*C*-1', *C*-1'') ppm.
- **HRMS (ESI⁺, 101):** m/z [M+H]⁺ berechnet für [C₉H₁₅O₄]⁺ 187.0965, gef.: 187.0963, m/z [M+Na]⁺ berechnet für [C₉H₁₄NaO₄]⁺ 209.0784, gef.: 209.0783.

2-((3R,3aS,6R,6aR)-3,6-Dihydroxyhexahydrofuro[3,2-b]furan-3-yl)acetaldehyd (103)Synthese nach **AAV2a****Ansatz:**

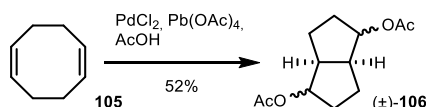
- (3R,3aS,6R,6aR)-3-Allylhexahydrofuro[3,2-b]furan-3,6-diol (**101**, 954 mg, 5.12 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 30 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{50\text{ L O}_2}{h} \cong \frac{3.0\text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (470 µL, 6.40 mmol, 1.25 eq)
- Konzentration auf c ≈ 500 mM eingestellt

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.16 und 0.09 (SiO₂, CH/EE 1:5, Anisaldehyd).
- **HPLC:** t_R = 10.7 min.

2,2'-((3R,3aS,6R,6aS)-3,6-Dihydroxyhexahydrofuro[3,2-b]furan-3,6-diyl)diacetaldehyd (104)Synthese nach **AAV2a****Ansatz:**

- (3R,3aS,6R,6aS)-3,6-Diallylhexahydrofuro[3,2-b]furan-3,6-diol (**102**, 679 mg, 3.00 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 18 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{50\text{ L O}_2}{h} \cong \frac{3.0\text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (440 µL, 6.00 mmol, 2.00 eq)
- Konzentration auf c ≈ 500 mM eingestellt

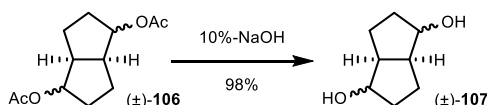
(±)-(3aS,6aS)-Octahydropentalen-1,4-diyl diacetat ((±)-106)Synthese nach HENRY *et al.*^[157]

Zu einer Mischung aus 1,5-Cyclooctadien (**105**, 12.3 mL, 100.0 mmol, 1.00 eq) und Palladium(II)chlorid (709 mg, 4.0 mmol, 4 mol-%) wurde eine Lösung von Blei(IV)tetraacetat (44.3 g, 100.0 mmol, 1.00 eq) in AcOH (100 mL) zugegeben und 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde über Celite® filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 10:1)

aufgereinigt, wobei (±)-**106** als gelbe Flüssigkeit erhalten wurde (11.7 g, 52.0 mmol, 52%, 95% Reinheit), welche direkt weiter umgesetzt wurde.

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.48$ (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd), $R_f = 0.15$ (SiO_2 , CH/EE 10:1, Anisaldehyd).
- **^1H -NMR (300.1 MHz, CDCl_3):** $\delta = 5.09\text{--}5.01$ (m, 2H, *H*-1, *H*-4), 2.73–2.61 (m, 2H, *H*-3a, *H*-6a), 2.01 (s, 6H, CO_2CH_3), 1.81–1.37 (m, 8H, *H*-2, *H*-3, *H*-4, *H*-6) ppm.
- **^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3):** $\delta = 170.8$ (CO_2CH_3), 77.2 (*C*-1, *C*-4), 44.8 (*C*-2, *C*-5), 32.3 (*C*-4, *C*-6), 22.9 (CO_2CH_3), 21.1 (*C*-3a, *C*-6a) ppm.

(±)-(3a*S*,6a*S*)-octahydropentalen-1,4-diol ((±)-107**)**

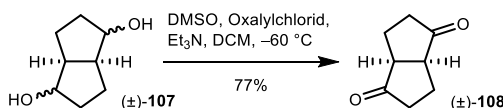


Synthese nach MORIARTY *et al.*^[158]

Zu einer NaOH-Lsg. (10%, 100 mL) wurde (±)-(3a*S*,6a*S*)-Octahydropentalen-1,4-diyldiacetat ((±)-**106**, 18.68 g, 83.0 mmol, 1.00 eq) bei 0 °C über 5 min zugetropft und im Anschluss über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Lösung wurde in eine Kutscher-Steudel-Apparatur überführt und 3 d mit Et_2O extrahiert. Die organische Phase wurde separiert, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wobei (±)-**107** gelbes Öl erhalten wurde (11.45 g, 80.5 mmol, 98%, 95% Reinheit).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.15$ (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **^1H -NMR (300.1 MHz, CDCl_3):** $\delta = 2.58\text{--}2.37$ (m, 2H, *H*-1, *H*-4), 1.91–1.46 (m, 8H, *H*-2, *H*-3, *H*-3a, *H*-5, *H*-6, *H*-6a) ppm.
- **^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3):** $\delta = 72.6$ (*C*-1, *C*-4), 49.0 (*C*-3a, *C*-6a), 38.9 (*C*-2, *C*-5), 20.3 (*C*-3, *C*-6) ppm.

(±)-(3a*S*,6a*S*)-Tetrahydropentalen-1,4(2*H*,5*H*)-dion ((±)-108**)**



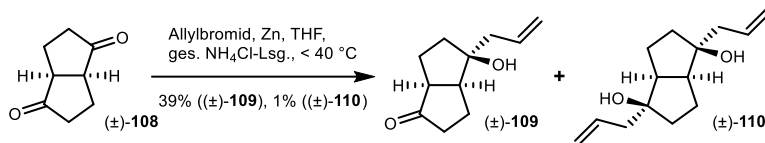
Swern-Oxidation nach CRAMER *et al.*^[156]

Zu einer Lösung von Oxalylchlorid (8.2 mL, 95.0 mmol, 2.20 eq) in DCM (abs., 90 mL) wurde DMSO (14.6 mL, 206.0 mmol, 4.80 eq) in DCM (abs., 5 mL) bei –60 °C langsam zugetropft und 10 min bei dieser Temperatur gerührt. Zu der Lösung wurde bei –60 °C das Diol ((±)-**107**, 6.13 g, 43.0 mmol, 1.00 eq) in DCM (abs., 19 mL) gegeben, 10 min gerührt und anschließend Et_3N (70 mL, 503 mmol, 11.70 eq) über 30 min zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, durch Zugabe von H_2O (49 mL) beendet und 15 min gerührt. Die organische Phase wurde separiert und fünfmal mit H_2O (je 25 mL) gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 4:1) aufgereinigt, wobei (±)-**108** als gelber kristalliner Feststoff erhalten wurde (4.67 g, 33.0 mmol, 77%).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.31$ (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **Schmelzbereich:** Smp. = 45–47 °C (Smp._{Lit.}^[158] = 45–46 °C).

- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** δ = 2.93–2.83 (m, 2H, *H*-3a, *H*-6a), 2.39–2.27 (*H*-3 α ²³, *H*-6 α), 2.20–1.99 (m, 6H, *H*-2, *H*-3 β , *H*-5, *H*-6 β) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** δ = 220.2 (*C*-1, *C*-4), 49.5 (*C*-3a, *C*-6a), 37.6 (*C*-2, *C*-5), 23.1 (*C*-3, *C*-6) ppm.

(\pm)-(3a*S*,4*R*,6a*S*)-4-Allyl-4-hydroxyhexahydropentalen-1(2*H*)-on ((\pm)-109**) und (1*R*,3a*S*,4*R*,6a*S*)-1,4-Diallyloctahydropentalen-1,4-diol ((\pm)-**110**)**



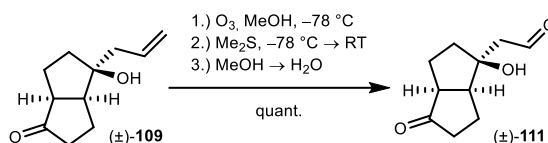
Anlehnung an MOSKALENKO *et al.*^[142]

(\pm)-(3a*S*,6a*S*)-Tetrahydropentalen-1,4(2*H*,5*H*)-dion ((\pm)-**108**, 4.57 g, 33.1 mmol, 1.0 eq) wurde in THF (10 mL) sowie ges. NH₄Cl-Lsg. (33 mL) gegeben und mit Allylbromid (60.1 mL, 695.8 mmol, 21.0 eq) versetzt. Zu der Mischung wurde portionsweise Zinkpulver (36.74 g, 561.8 mmol, 17.0 eq) so zugegeben, dass die Innentemperatur 40 °C nicht überstieg (Eisbad). Bei unvollständigem Umsatz wurde dreimal jeweils Allylbromid (14.3 mL, 165.6 mmol, 5.0 eq) und Zinkpulver (8.66 g, 132.4 mmol, 4.0 eq) zugegeben und über Nacht gerührt. Zur Reaktionsmischung wurde H₂SO₄ (10%, 25 mL) zugegeben, für 15 min bei Raumtemperatur gerührt, über eine Fritte (P3) filtriert und die organische Phase separiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Et₂O (je 100 mL) extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 10:1) aufgereinigt, wobei (\pm)-**109** und (\pm)-**110** jeweils als gelbes Öl erhalten wurden ((\pm)-**109**: 2.32 g, 12.9 mmol, 39% und (\pm)-**110**: 0.14 g, 1.5 mmol, 1%).

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f ((\pm)-**109**) = 0.28 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd), R_f ((\pm)-**110**) = 0.41 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃, (\pm)-**109**):** δ = 5.83 (dddd, J = 16.1, 10.9, 8.0, 7.0 Hz, 1H, *H*-2'), 5.17–5.07 (m, 2H, *H*-3'), 2.63 (ddt, J = 10.0, 5.2, 1.7 Hz, 1H), 2.49–2.29 (m, 3H), 2.18–2.13 (m, 2H), 2.05–1.80 (m, 4H), 1.69–1.60 (m, 2H), 1.57 (s, 1H, OH) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, (\pm)-**109**):** δ = 223.6 (*C*-1), 133.8 (*C*-2'), 119.2 (*C*-3'), 82.0 (*C*-4), 51.5 (*C*-6a), 49.7 (*C*-3a), 43.8 (*C*-1'), 39.3 (*C*-5), 37.9 (*C*-6), 25.0 (*C*-2), 19.9 (*C*-3) ppm.
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃, (\pm)-**110**):** δ = 5.85 (ddt, J = 17.7, 9.5, 7.5 Hz, 2H, *H*-2', *H*-2''), 5.10–5.00 (m, 4H, *H*-3', *H*-3''), 3.43 (s, 2H, 2x OH), 2.46–2.35 (m, 2H, *H*-3a, *H*-6a), 2.23 (dd, J = 7.5, 1.2 Hz, 4H, *H*-1', *H*-1''), 1.87–1.49 (m, 8H, *H*-2, *H*-3, *H*-5, *H*-6) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, (\pm)-**110**):** δ = 135.0 (*C*-2', *C*-2''), 117.7 (*C*-3', *C*-3''), 79.7 (*C*-1, *C*-4), 52.7 (*C*-3a, *C*-6a), 44.0, 42.9, 20.7 (*C*-3, *C*-6) ppm.

²³ Hier wurde jeweils α und β für eines der Protonen an der CH₂-Gruppe in 3- bzw. 6-Position verwendet, da sich im Ringsystem die Positionen 3a und 6a befinden und diese ebenfalls mit Protonen belegt sind.

2-((1S,3aS,6aS)-1-Hydroxy-4-oxooctahydropentalen-1-yl)acetaldehyd ((±)-111)



Synthese nach **AAV2a**

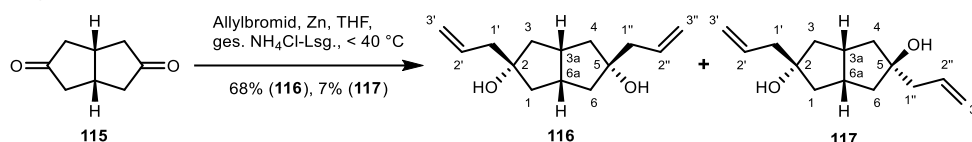
Ansatz:

- (3aS,4S,6aS)-4-Allyl-4-hydroxyhexahydropentalen-1(2H)-on ((±)-**109**, 901 mg, 5.00 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 30 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{50 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{3.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (460 µL, 6.40 mmol, 1.25 eq)
- Konzentration auf c ≈ 500 mM eingestellt

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.12 (SiO₂, CH/EE 1:5, Anisaldehyd, Seebach, DNPH).
- **HPLC:** t_R = 23.8 min.

(2s,3as,5s,6as)-2,5-Diallyloctahydropentalen-2,5-diol (**116**) und (2r,3aR,5s,6aS)-2,5-Diallyloctahydropentalen-2,5-diol (**117**)



Synthese nach **AAV1**, Anlehnung an KOTHA *et al.* [211]

Ansatz:

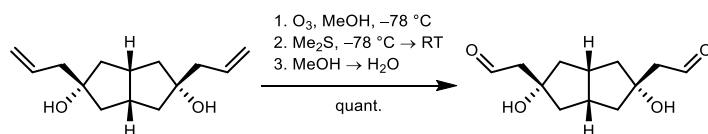
- (3as,6as)-Tetrahydropentalen-2,5(1H,3H)-dion (**115**, 6.79 g, 70.0 mmol, 1.0 eq)
- Allylbromid (39.4 mL, 455.0 mmol, 6.5 eq)
- Zinkpulver (29.76 g, 455.0 mmol, 6.5 eq)
- ges. NH₄Cl-Lsg. (100 mL)
- THF (50 mL)

Aufreinigung:

- Die Reaktionsmischung wurde über eine Fritte (P4) filtriert, mit Et₂O (100 mL) gewaschen und die organischen Phasen separiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Et₂O (je 150 mL) extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (CHCl₃) aufgereinigt, wobei **116** und **117** jeweils als farbloser kristalliner Feststoff erhalten wurden (**116**: 10.6 g, 47.6 mmol, 68% und **117**: 1.14 g, 5.1 mmol, 7%)

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f(\mathbf{116}) = 0.19$ (SiO_2 , CHCl_3 , Anisaldehyd), $R_f(\mathbf{117}) = 0.04$ (SiO_2 , CHCl_3 , Anisaldehyd).
- **Schmelzbereich:** Smp.($\mathbf{116}$) = 88–90 °C (Smp.Lit.($\mathbf{116}$)^[211] = 82–84 °C), Smp.($\mathbf{117}$) = 108–109 °C, (Smp.Lit.($\mathbf{117}$)^[211] = 102–104 °C).
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3 , $\mathbf{116}$):**²⁴ $\delta = 5.88$ (ddt, $J = 16.4, 10.8, 7.3$ Hz, 2H, $H-2'$, $H-2''$), 5.13–5.04 (m, 4H, $H-3'$, $H-3''$), 3.42 (s, 2H, 2x OH), 2.68–2.53 (m, 2H, $H-3a$, $H-6a$), 2.26 (dt, $J = 7.3, 1.2$ Hz, 4H, $H-1'$, $H-1''$), 1.95 (dd, $J = 13.9, 9.5$ Hz, 4H, $H-1_\gamma$, $H-3_\gamma$, $H-4_\gamma$, $H-6_\gamma$), 1.75 (dd, $J = 13.9, 3.3$ Hz, 4H, $H-1_\tau$, $H-3_\tau$, $H-4_\tau$, $H-6_\tau$) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , $\mathbf{116}$):** $\delta = 134.8$ ($C-2'$, $C-2''$), 118.2 ($C-3'$, $C-3''$), 83.6 ($C-2$, $C-5$), 46.7 ($C-1$, $C-3$, $C-4$, $C-6$), 45.9 ($C-3a$, $C-6a$), 42.1 ($C-1'$, $C-1''$) ppm.
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3 , $\mathbf{117}$):**²⁵ $\delta = 5.93$ –5.78 (m, 2H, $H-2'_\gamma$, $H-2'_\tau$), 5.19–5.05 (m, 4H, $H-3'_\gamma$, $H-3'_\tau$), 2.85–2.70 (m, 2H, $H-3a$, $H-6a$), 2.34 (dt, $J = 7.7, 1.0$ Hz, 2H, $H-1'_\tau$), 2.38 (dt, $J = 7.7, 1.0$ Hz, 2H, $H-1'_\gamma$), 1.93–1.81 (m, 4H), 1.70–1.61 (m, 2H), 1.58–1.39 (m, 4H, 2x OH) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , $\mathbf{117}$):** $\delta = 134.8$ ($C-2'_\chi$), 134.4 ($C-2'_\chi$), 119.2 ($C-3'_\chi$), 118.5 ($C-3'_\chi$), 84.3 (C_q), 84.1 (C_q), 47.0 ($C-3a$, $C-6a$), 45.9 ($C-1'_\chi$), 45.5 ($C-1'_\chi$), 45.3 ($C-4$, $C-6$), 41.3 ($C-1$, $C-3$) ppm.

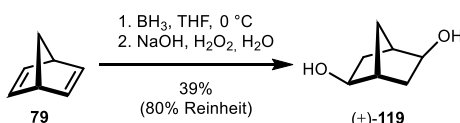
2,2'-((2*r*,3*ar*,5*r*,6*ar*)-2,5-Dihydroxyoctahydropentalen-2,5-diyl)diacetaldehyd (118**)**Synthese nach **AAV2a****Ansatz:**

- (2*s*,3*as*,5*s*,6*as*)-2,5-Diallyloctahydropentalen-2,5-diol (**116**, 1.11 g, 5.0 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 30 mL)
- O_3 (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{100 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{5.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me_2S (460 μL , 6.3 mmol, 1.25 eq)
- Konzentration auf $c \approx 500$ mM eingestellt

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.02$ (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd).

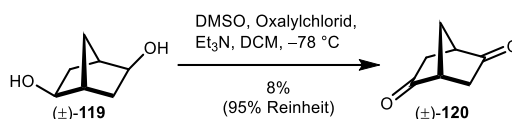
²⁴Der Deskriptor γ bzw. τ steht für die Protonen, die *cis*- bzw. *trans*-ständig zu den Protonen in Position 3a und 6a sind.²⁵Der Deskriptor γ bzw. τ steht für die Allylgruppe, die *cis*- bzw. *trans*-ständig zu den Protonen in Position 3a und 6a ist. Im¹³C-NMR sind Signale, die nicht eindeutig einer der beiden Allylgruppen zugeordnet werden können, mit einem χ versehen.

(±)-*exo,exo*-Bicyclo[2.2.1]heptan-2,5-diol ((±)-119)

Synthese nach GOGNON *et al.*^[161]

Norbornadien (**79**, 9.20 g, 100.0 mmol, 1.00 eq) wurde in THF (abs., 100 mL) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und BH₃-THF (1 M, 100 mL, 100.0 mmol, 1.00 eq) langsam zugetropft, danach THF (abs., 100 mL) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Lösung wurden NaOH-Lsg. (2 M, 40 mL) und dann Wasserstoffperoxid-Lsg. (30%, 40 mL) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit wenig Ethanol versetzt. Der unlösliche Rückstand wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde zweimal aus Et₂O/EtOH (1:1) umkristallisiert, wobei (±)-**119** als farblose, viskose Flüssigkeit erhalten wurde (4.98 g, 38.9 mmol, 39%²⁶, 80% Reinheit).

- **¹H-NMR (300.1 MHz, Methanol-*d*₄):** δ = 4.78 (s, 2H, OH), 3.58–3.51 (dd, *J* = 6.5, 2.0 Hz, 2H, *H*-2, *H*-5), 2.09–2.02 (m, 2H, *H*-1, *H*-4), 1.50 (s, 2H, CH₂), 1.47–1.36 (m, 2H, *H*-3a, *H*-6a), 1.24–1.12 (m, 2H, *H*-3a, *H*-6a) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, Methanol-*d*₄):** δ = 74.3 (*C*-2, *C*-5), 44.2 (*C*-1, *C*-4), 37.3 (*C*-3, *C*-6), 31.0 (CH₂) ppm.

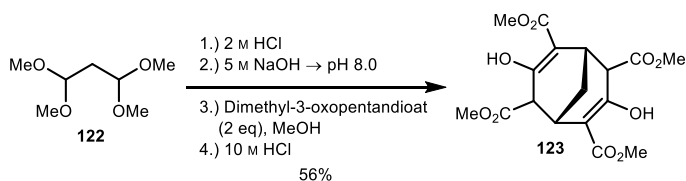
Bicyclo[2.2.1]heptan-2,5-dion ((±)-120)

Synthese nach NOËL *et al.*^[162]

In einem 1 L-Dreihalsrundkolben mit KPG-Rührer wurde DCM (abs., 250 mL) vorgelegt und auf –78 °C gekühlt. Anschließend wurden Oxalylchlorid (9.0 mL, 94.5 mmol, 1.26 eq) und DMSO (13.4 mL, 189.0 mmol, 2.52 eq) zugegeben und für 10 min bei dieser Temperatur gerührt. Das Diol ((±)-**119**, 9.60 g, 74.9 mmol, 1.00 eq) wurde in DCM (abs., 500 mL) gelöst langsam zur Reaktionsmischung zugegeben. Nach 20 min wurde Triethylamin (52.0 mL, 343.0 mmol, 4.58 eq) langsam zugetropft und für 1 h weiter bei –78 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von HCl-Lsg. (1 M, 250 mL) beendet und die Lösung viermal mit DCM/Et₂O (1:1, je 250 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit ges. NaHCO₃-Lsg. (500 mL), einmal mit ges. NaCl-Lsg. (500 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 50:1) aufgereinigt, wobei eine bräunliche, semikristalline Flüssigkeit (2.73 g, 22.0 mmol, 29%, 80% Reinheit) erhalten wurde. Der Rückstand wurde zweimal aus PE/Et₂O (1:3) umkristallisiert, wobei (±)-**120** als farblose Kristallnadeln erhalten wurde (774 mg, 8.0 mmol, 8%, 95% Reinheit).

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.29 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd, DNPH).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** δ = 2.96 (dt, *J* = 6.3, 1.6 Hz, 2H, *H*-1, *H*-4), 2.36 (ddd, *J* = 17.8, 4.5, 2.0 Hz, 2H, *H*-3_{eq}, *H*-6_{eq}), 2.13 (ddd, *J* = 17.8, 2.4, 1.5, 2H, *H*-3_{ax}, *H*-6_{ax}), 2.08–2.06 (m, 2H, CH₂) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** δ = 212.3 (*C*-2, *C*-5), 48.6 (*C*-1, *C*-4), 38.9 (*C*-3, *C*-6), 36.4 (CH₂) ppm.

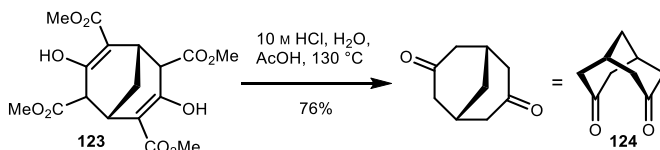
²⁶ Verunreinigung bereits mit eingerechnet.

Tetramethyl-3,7-dihydroxybicyclo[3.3.1]nona-2,6-dien-2,4,6,8-tetracarboxylat (123)

Synthese nach TOMIZAWA *et al.*^[212]

Eine Lösung aus 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (**122**, 25.4 g, 150.0 mmol, 1 eq) und HCl-Lsg. (2 M, 77.5 mL) wurde für 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde anschließend auf 0 °C abgekühlt und über 40 min eine NaOH-Lsg. (5 M) zugetropft bis pH 8 erreicht wurde. Die Lösung wurde mit MeOH (75.5 mL) verdünnt und dazu bei 0 °C Dimethyl-3-oxopentandioat (53.8 g, 300.0 mmol, 2.0 eq) und im Anschluss für 6 d bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit HCl-Lsg. (10 M) auf pH 3 eingestellt, der ausgefallene Niederschlag abfiltriert, mit wenig HCl-Lsg. (2 M) gewaschen und im Vakuum getrocknet wobei **123** als farbloser kristalliner Feststoff erhalten wurde (32.9 g, 86.0 mmol, 56%).

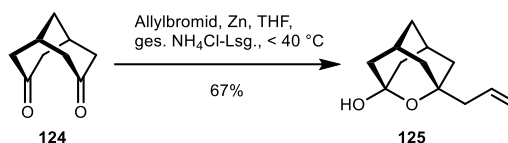
- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.30$ (SiO₂, CH/EE 1:1, Anisaldehyd).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** $\delta = 3.84$ (s, 6H, CO₂CH₃), 3.77 (s, 6H, CO₂CH₃), 3.29 (s, 2H, H-4, H-8), 3.28–3.18 (m, 2H, H-1, H-5), 1.94 (t, $J = 3.2$ Hz, 2H, CH₂) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** $\delta = 171.8$ (C-3, C-7), 170.8 (2x CO₂Me), 168.1 (2x CO₂Me), 102.0 (C-2, C-6), 52.6 (2x OCH₃), 52.2 (2x OCH₃), 50.3 (C-4, C-8), 30.0 (CH₂), 22.4 (C-1, C-5) ppm.

Bicyclo[3.3.1]nonan-3,7-dion (124)

Synthese nach BERTZ *et al.*^[163]

Eine Suspension aus des Esters (**123**, 37.6 g, 98.0 mmol, 1.0 eq) in HCl-Lsg. (10 M, 100 mL), H₂O (100 mL) und Eisessig (200 mL) wurde für 6 h bei 130 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung auf Eis (200 g) gegeben und viermal mit DCM (je 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaHCO₃-Lsg. (200 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde aus ⁿHeptan umkristallisiert, wobei **124** als blassgelber kristalliner Feststoff erhalten wurde (11.3 g, 74.0 mmol, 76%).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.20$ (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **Schmelzbereich:** Smp. = 219 °C.
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** $\delta = 2.99$ –2.77 (m, 2H, H-1, H-5), 2.56 (dd, $J = 15.2, 5.4$ Hz, 4H, H-2a, H-4a, H-6, H-8a), 2.37 (d, $J = 15.6$ Hz, 4H, H-2b, H-4b, H-6b, H-8b), 2.23–2.18 (m, 2H, CH₂) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** $\delta = 47.8$ (C-2, C-4, C-6, C-8), 32.6 (C-1, C-5), 31.4 (CH₂) ppm.

(1*r*,3*r*)-3-Allyl-2-oxadamantan-1-ol (125)Synthese nach **AAV1****Ansatz:**

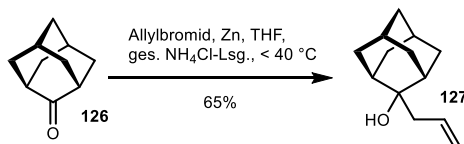
- Bicyclo[3.3.1]nonan-3,7-dion (**124**, 152 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq)
- Allylbromid (430 µL, 5.00 mmol, 5.0 eq)
- Zinkpulver (262 mg, 4.00 mol, 4.0 eq)
- ges. NH₄Cl-Lsg. (0.3 mL)
- THF (1 mL)

Aufreinigung:

- Die Reaktion wurde durch Zugabe von H₂SO₄-Lsg. (10%, 0.3 mL) beendet und über eine Fritte (P4) filtriert. Die organische Phase wurde separiert, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Rohsubstanz wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 3:1) aufgereinigt, wobei **125** als farbloser kristalliner Feststoff erhalten wurde (110 mg, 0.67 mmol, 67%).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.37 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **Schmelzbereich:** Smp. = 100–101 °C.
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** δ = 5.82 (ddt, *J* = 15.8, 11.4, 7.4 Hz, 1H, *H*-2'), 5.07–4.99 (m, 2H, *H*-3'), 3.50 (s, OH), 2.35–2.27 (m, 2H, *H*-5, *H*-7), 2.19 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, *H*-1'), 1.81–1.68 (m, 4H, *H*-8, *H*-9), 1.68–1.58 (m, 4H, *H*-6, *H*-4a, *H*-10a), 1.50–1.41 (m, 2H, *H*-4b, *H*-10b) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** δ = 133.5 (*C*-3'), 117.8 (*C*-2'), 94.9 (*C*-1), 76.5 (*C*-3), 46.8 (*C*-1'), 41.4 (*C*-8, *C*-9), 38.6 (*C*-4, *C*-10), 34.1 (*C*-6), 29.6 (*C*-5, *C*-7) ppm.

(1*r*,3*r*)-2-Allyladamantan-2-ol (127)Synthese nach **AAV1****Ansatz:**

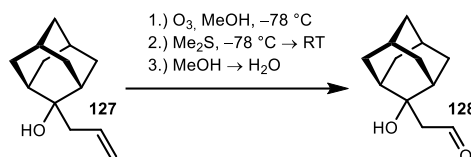
- (1*r*,3*r*)-Adamantan-2-on (**126**, 1.13 g, 7.5 mol, 1.0 eq)
- Allylbromid (1.6 mL, 18.8 mol, 2.5 eq)
- Zinkpulver (981 mg, 15.0 mol, 2.0 eq)
- ges. NH₄Cl-Lsg. (7 mL)
- THF (2 mL)

Aufreinigung:

- Die Reaktion wurde durch Zugabe von H₂SO₄-Lsg. (10%, 3 mL) beendet, über eine Fritte (P3) filtriert und mit Et₂O (25 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Et₂O (je 25 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wobei **127** als gelbe Kristallkuben mit Kieferngeruch erhalten wurde (948 mg, 4.9 mol, 65%).

Analytik:

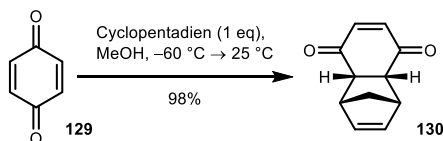
- Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.68 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd, Seebach).
- Schmelzbereich:** Smp. = 39–41 °C.
- ¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** δ = 5.90 (ddt, *J* = 15.1, 11.0, 7.5 Hz, 1H, *H*-2'), 5.20–5.10 (m, 2H, *H*-3'), 2.45 (dt, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 2H, *H*-1'), 2.24–2.16 (m, 2H), 1.95–1.78 (m, 4H), 1.77–1.62 (m, 6H), 1.59–1.50 (m, 2H) ppm.
- ¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** δ = 133.9 (*C*-2'), 118.9 (*C*-3'), 74.7 (*C*-2), 42.9, 38.5, 37.2, 34.6, 33.1, 27.58, 27.5 ppm.

2-((1*r*,3*r*)-2-Hydroxyadamantan-2-yl)acetaldehyd (128**)**Synthese nach **AAV2a****Ansatz:**

- 2-Methyl-4-penten-2-ol (**127**, 501 mg, 5.00 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 30 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{100 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{5.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (460 μL, 6.25 mmol, 1.25 eq)

Aufreinigung:

- Die Konzentration der Lösung wurde auf *c* ≈ 500 mm eingestellt. Beim Einengen der Lösung in H₂O trat relativ schnell eine Trübung, gefolgt von Ausflocken eines Niederschlages ein.

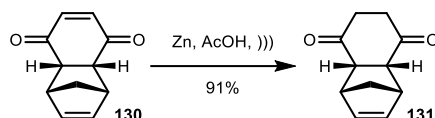
(1*R*,4*S*,4*aR*,8*aS*)-1,4,4*a*,8*a*-Tetrahydro-1,4-methanonaphthalen-5,8-dion (130**)**Synthese nach TORMENA *et al.*^[164]

para-Benzoquinon (**129**, 10.81 g, 100.0 mmol, 1.00 eq) wurde in MeOH gelöst (350 mL) und auf -55 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde Cyclopentadien (6.87 g, 104.0 mmol, 1.04 eq, vorher bei 200 °C gecrackt und durch Destillation gereinigt) in MeOH (50 mL, auf -55 °C gekühlt) gegeben und die Reaktion langsam unter Rühren

auf 25 °C erwärmt (etwa 1 h). Die Lösung wurde im Vakuum eingengt und der Rückstand aus Petrolether (40-60) umkristallisiert, wobei **130** als gelber kristalliner Feststoff erhalten wurde (17.00 g, 97.6 mmol, 98%).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.35$ (SiO_2 , CH/EE 4:1, KMnO_4).
- **Schmelzbereich:** Smp.: 69–70 °C.
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3):** $\delta = 6.52$ (s, 2H, $H-6$, $H-7$), 6.01 (t, $J = 1.9$ Hz, 2H, $H-2$, $H-3$), 3.51–3.47 (m, 2H, $H-1$, $H-4$), 3.19–3.16 (m, 2H, $H-4a$, $H-8a$), 1.49 (dt, $J = 8.8$, 1.7 Hz, 1H, CH_θH), 1.38 (dt, $J = 8.8$, 1.7 Hz, 1H, CHH_θ) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3):** $\delta = 199.4$ (C-5, C-8), 142.1 (C-6, C-7), 135.3 (C-2, C-3), 48.8 (C-4a, C-8a), 48.7 (CH_2), 48.4 (C-1, C-4) ppm.

(1*R*,4*S*,4a*R*,8a*S*)-1,4,4a,6,7,8a-Hexahydro-1,4-methanonaphthalen-5,8-dion (131**)**

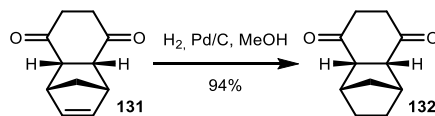


Synthese nach MARCHAND *et al.*^[165]

Zu einer Lösung des α,β -ungesättigten Dions (**130**, 1.74 g, 10.0 mmol, 1.00 eq) in AcOH (26 mL) wurde Zinkpulver (2.62 g, 40 mol, 4.00 eq) gegeben und die Reaktionsmischung 3.5 h im Ultraschallbad beschallt. Die Mischung wurde mit ges. NaCl-Lsg. (50 mL) versetzt. Die Mischung wurde filtriert, die organische Phase separiert und die wässrige Phase zweimal mit DCM (je 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H_2O (je 50 mL), ges. NaHCO_3 -Lsg. (100 mL) und H_2O (50 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wobei **131** als farbloses Öl erhalten wurde (1.60 g, 9.1 mmol, 91%). Das Öl wurde ohne weitere Aufreinigung direkt weiter eingesetzt.

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.17$ (SiO_2 , CH/EE 4:1, Seebach).
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, $\text{DMSO}-d_6$):** $\delta = 6.13$ (t, $J = 1.9$ Hz, 2H, $H-2$, $H-3$), 3.43–3.37 (m, 2H, $H-1$, $H-4$), 3.19–3.16 (m, 2H, $H-4a$, $H-8a$), 2.67–2.52 (m, 2H, $H-6'$, $H-7'$), 2.33–2.19 (m, 2H, $H-6''$, $H-7''$), 1.46–1.41 (dt, $J = 8.7$, 1.9 Hz, 1H, CH_θH), 1.34–1.29 (dt, $J = 8.7$, 1.2 Hz, 1H, CHH_θ) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, $\text{DMSO}-d_6$):** $\delta = 209.5$ (C-5, C-8), 136.7 (C-2, C-3), 51.9 (C-4a, C-8a), 47.5 (C-1, C-4), 47.5 (CH_2), 38.0 (C-6, C-7) ppm.

(1*R*,4*S*,4a*S*,8a*R*)-Octahydro-1,4-methanonaphthalen-5,8-dion (132**)**

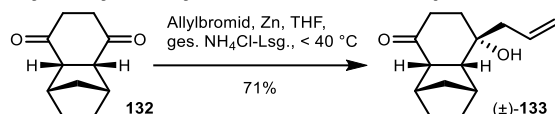


Anlehnung an WALKER *et al.*^[213]

Das Dion (**131**, 6.3 g, 33.6 mmol, 1.0 eq) wurde in EtOH (160 mL) gelöst und mit 10%-Pd/C (0.65 g, 10 Gew.-%) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde dreimal mit H_2 gespült und anschließend 45 min bei 25 °C unter H_2 -Atmosphäre (1 bar) gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend über Celite® filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene ölige Rückstand kann säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 6:1 \rightarrow 4:1) aufgereinigt oder alternativ aus n -Pentan/ Et_2O (1:1) umkristallisiert werden. **132** wurde als schwach gelblicher kristalliner Feststoff erhalten (5.63 g, 31.6 mmol, 94%).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.20$ (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **Schmelzbereich:** Smp. = 52–54 °C (aus n -Pentan/ Et_2O 1:1).
- **^1H -NMR (300.1 MHz, CDCl_3):** $\delta = 2.92\text{--}2.87$ (m, 2H, $H\text{-}4a$, $H\text{-}8a$), $2.81\text{--}2.66$ (m, 4H, $H\text{-}1$, $H\text{-}4$, $H\text{-}6a$, $H\text{-}7a$), $2.51\text{--}2.37$ (m, 2H, $H\text{-}6b$, $H\text{-}7b$), $1.52\text{--}1.41$ (m, 2H, $H\text{-}2a$, $H\text{-}3a$), $1.39\text{--}1.34$ (m, 2H, CH_2), $1.28\text{--}1.20$ (m, 2H, $H\text{-}2b$, $H\text{-}3b$) ppm.
- **^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3):** $\delta = 210.4$ (C-5, C-8), 52.1 (C-4a, C-8a), 41.7 (C-1, C-4), 39.1 (C-6, C-7), 38.8 (CH_2), 24.7 (C-2, C-3) ppm.

(\pm)-(1*R*,4*S*,4*aS*,8*S*,8*aR*)-8-Allyl-8-hydroxyoctahydro-1,4-methanonaphthalen-5(1*H*)-on ((\pm)-133)

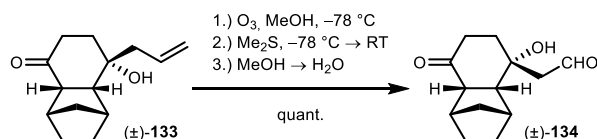


Synthese nach AAV1

Das Dion (**132**, 178 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq) und Allylbromid (520 μL , 6.00 mmol, 6.0 eq) wurden in THF (1 mL) und ges. NH_4Cl -Lsg. (0.3 mL) gegeben. Unter Rühren wurde portionsweise Zinkpulver (314 mg, 4.80 mmol, 4.8 eq) so zugegeben, dass die Innentemperatur 40 °C nicht überstieg (Eisbad) und anschließend bei 25 °C für 1 h gerührt. Zu der Reaktionsmischung wurde eine H_2SO_4 -Lsg. (10%, 0.4 mL) zugegeben und für 15 min bei 25 °C gerührt. Die Suspension wurde filtriert und der Rückstand mit Et_2O (20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde separiert und die wässrige Phase zweimal mit Et_2O (je 10 mL) extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 6:1) aufgereinigt, wobei (\pm)-**133** als farbloser kristalliner Feststoff erhalten wurde (105 mg, 0.48 mmol, 71% bezogen auf 0.32 mmol zurückgewonnenem Edukt).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.39$ (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **Schmelzbereich:** Smp. = 109–115 °C.
- **^1H -NMR (300.1 MHz, CDCl_3):** $\delta = 5.87$ (ddt, $J = 17.6, 10.3, 7.5$ Hz, 1H, $H\text{-}2'$), $5.23\text{--}5.10$ (m, 2H, $H\text{-}3'$), $2.64\text{--}2.59$ (m, 1H, $H\text{-}1$), $2.55\text{--}2.46$ (m, 2H, $H\text{-}4$, $H\text{-}4a$), $2.45\text{--}2.32$ (m, 3H, $H\text{-}1'$, 1x $H\text{-}7$), $2.32\text{--}2.19$ (m, 2H, 1x $H\text{-}7$, $H\text{-}8a$), $2.17\text{--}2.08$ (m, 1H, 1x $H\text{-}2$), $1.90\text{--}1.82$ (m, 2H, $H\text{-}6$), $1.59\text{--}1.46$ (m, 1H, 1x $H\text{-}3$), $1.45\text{--}1.36$ (m, 1H, 1x $H\text{-}3$), $1.35\text{--}1.28$ (m, 2H, CH_2), $1.27\text{--}1.17$ (m, 1H, 1x $H\text{-}2$) ppm.
- **^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3):** $\delta = 213.8$ (C-5), 133.3 (C-2'), 119.7 (C-3'), 72.8 (C-8), 51.4 (C-4a), 48.7 (C-8a), 46.1 (C-1'), 40.4 (C-4, CH_2), 39.2 (C-1), 35.8 (C-7), 34.3 (C-6), 24.9 (C-2), 23.6 (C-3) ppm.
- **HRMS (ESI+):** m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet für $[\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{NaO}_2]^+$ 243.1356, gef.: 243.1354, m/z $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ berechnet für $[\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{NaO}_4]^+$ 463.2819, gef.: 463.2818.

(\pm)-2-((1*S*,4*R*,4*aR*,5*R*,8*aS*)-5-hydroxy-8-oxodecahydro-1,4-methanonaphthalen-5-yl)acetaldehyd ((\pm)-134)



Synthese nach AAV2a

Ansatz:

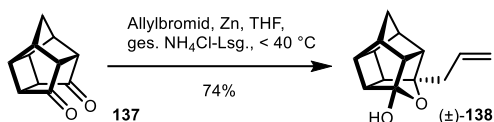
- Allylalkohol ((\pm)-**133**, 661 mg, 3.00 mmol, 1.00 eq)

- MeOH (abs., 30 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{50 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{3.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (275 µL, 3.75 mmol, 1.25 eq)
- Konzentration auf c ≈ 250 mM eingestellt

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.08 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **HPLC:** t_R = 20.1 min.

(±)-(2*S*,2*a*¹*S*,5*R*,6*R*,7*S*,8*S*)-6*a*-Allyloctahydro-2*H*-2,6,3,5-(epiethane[1,1,2]tetrayl)-pentaleno[1,6-*bc*]furan-2-ol ((±)-138)



Synthese nach **AAV1**

Ansatz:

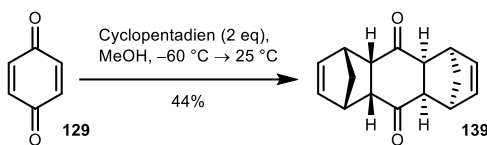
- Hexahydro-1*H*-2,4,1-(epiethane[1,1,2]triyl)cyclobuta[*cd*]-pentalen-5,7(1*aH*)-dion (**137**, 174 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq)
- Allylbromid (520 µL, 6.00 mmol, 6.0 eq)
- Zinkpulver (314 mg, 4.80 mol, 4.8 eq)
- ges. NH₄Cl-Lsg. (1.0 mL)
- THF (0.4 mL)

Aufreinigung:

- Die Reaktionsmischung wurde über eine Fritte (P3) filtriert, zweimal mit Et₂O (je 10 mL) gewaschen, die organischen Phasen vereinigt, über MgSO₄ getrocknet und Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Rohsubstanz wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 2:1) aufgereinigt, wobei (±)-**138** als farbloses Öl erhalten wurde (159 mg, 0.74 mmol, 74%).

Analytik:

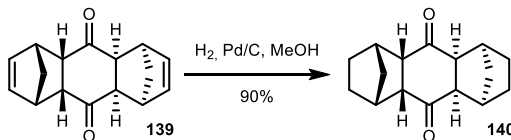
- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.32 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd, Seebach).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** δ = 5.78 (ddt, *J* = 17.2, 10.1, 7.3 Hz, 1H), 5.17–5.03 (m, 2H, *H*-3'), 4.57 (s, OH), 2.78–2.68 (m, 1H), 2.66–.54 (m, 6H), 2.50 (m, 1H), 2.45–2.37 (dd, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 2H), 1.88–1.80 (m, 1H, CH₂), 1.53–1.48 (m, 1H, CH₂) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** δ = 133.7 (*C*-2'), 118.4 (*C*-2), 117.9 (*C*-3'), 91.4 (*C*-6*a*), 58.0, 57.8, 47.7, 47.6, 45.2, 43.98, 43.4, 42.2, 41.9, 37.8 (CH₂) ppm.

(1R,4S,4aR,5S,8R,8aS,9aS,10aR)-1,4,4a,5,8,8a,9a,10a-Octahydro-1,4:5,8-dimethananthracen-9,10-dion (139)

Synthese nach RATHORE *et al.*^[168]

para-Benzochinon (**129**, 21.60 g, 200.0 mmol, 1.00 eq) wurde in EtOH (200 mL) gelöst und 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurde Cyclopentadien (26.40 g, 400.0 mmol, 2.00 eq, vorher bei 200 °C gecrackt und durch Destillation gereinigt) zugetropft, 20 min bei 0 °C gerührt und dann langsam unter Rühren auf 25 °C erwärmt (etwa 1 h). Die Lösung wurde erneut auf 0 °C gekühlt, filtriert und mit eiskaltem EtOH (10 mL) gewaschen, wobei **139** als hellgelber kristalliner Feststoff erhalten wurde (21.00 g, 87.0 mmol, 44%).

- **Schmelzbereich:** Smp. = 157 °C (Smp._{Lit.}^[168] = 157–158 °C).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** δ = 6.12 (dd, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 4H, *H*-2, *H*-3, *H*-6, *H*-7), 3.30–3.25 (m, 4H, *H*-1, *H*-4, *H*-5, *H*-8), 2.85–2.75 (m, 4H, *H*-4a, *H*-8a, *H*-9a, *H*-10a), 1.39 (dt, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 2H, CH_aH_b), 1.22 (dt, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 2H, CH_aH_b) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** δ = 212.4 (*C*-9, *C*-10), 136.3 (*C*-2, *C*-3, *C*-6, *C*-7), 53.1 (*C*-4a, *C*-8a, *C*-9a, *C*-10a), 49.5 (2x CH₂), 48.2 (*C*-1, *C*-4, *C*-5, *C*-8) ppm.

(1R,4S,4aS,5S,8R,8aR,9aR,10aS)-Dodecahydro-1,4:5,8-dimethananthracen-9,10-dion (140)

Synthese nach RATHORE *et al.*^[168]

Das Diketon (**139**, 20.00 g, 83.0 mmol, 1.00 eq) wurde in einer Mischung aus EtOH (50 mL) und EE (250 mL) gegeben und mit 10%-Pd/C (200 mg, 1 Gew.-%) versetzt. Die Suspension wurde 24 h unter H₂-Atmosphäre gerührt, dann DCM (200 mL) zugegeben und über Celite® filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, wobei **140** als farbloser kristalliner Feststoff erhalten wurde (19.95, 82.0 mmol, 98%).

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.39 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **Schmelzbereich:** Smp. = 227 °C (Zersetzung, Smp._{Lit.}^[168] = 226–229 °C).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** δ = 2.92–2.83 (m, 4H, *H*-4a, *H*-8a, *H*-9a, *H*-10a), 2.82–2.74 (m, 4H, *H*-1, *H*-4, *H*-5, *H*-8), 1.57–1.45 (m, 4H), 1.45–1.35 (m, 4H), 1.34–1.21 (m, 4H) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** δ = 214.3 (*C*-9, *C*-10), 53.6 (*C*-4a, *C*-8a, *C*-9a, *C*-10a), 43.8 (*C*-1, *C*-4, *C*-5, *C*-8), 39.3 (CH₂), 25.0 (*C*-2, *C*-3, *C*-6, *C*-7) ppm.

5.4.4 Versuche zu Kapitel 3.2.1

Die Testreaktionen wurden nach **AAV3** durchgeführt. Die Ansatzmengen und analytischen Ergebnisse sind in Tabelle 32 zusammengefasst.

Tabelle 32. Substratscreening mit FSA^{wt} und FSA^{A129S}.

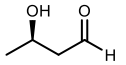
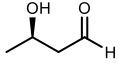
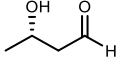
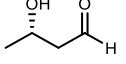
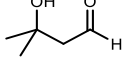
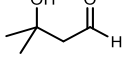
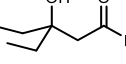
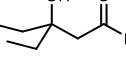
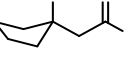
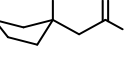
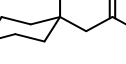
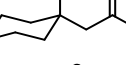
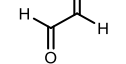
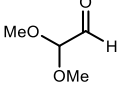
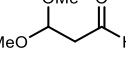
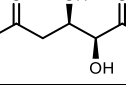
Akzeptor	c _{Akzeptor} ^a [mM]	Donor	c _{Donor} ^a [mM]	FSA*	DC ^c	R _f	HPLC ^d	t _R ^e [min]
 (R)-8	50	HA	150	wt	+	0.20 (CH/EE 1:5)	+	11.0 + 11.4
 (R)-8	50	DHA	150	A129S	+	0.07 (CH/EE 1:5)	+	9.3
 (S)-8	50	HA	150	wt	+	0.11 (CH/EE 1:5)	+	10.1 + 10.8
 (S)-8	50	DHA	150	A129S	+	0.07 (CH/EE 1:5)	+	10.1 + 10.9
 73a	<50 ^b	HA	150	wt	+	0.21 (CH/EE 1:5)	+	12.1 + 12.3
 73a	<50 ^b	DHA	150	A129S	+	0.33 (CH/EE 1:5)	+	10.0 + 10.6
 73b	<<50 ^b	HA	150	wt	+	0.37 (CH/EE 1:5)	+	15.9 + 16.5
 73b	<<50 ^b	DHA	150	A129S	+	0.17 (DCM/MeOH 10:1)	+	13.9
 73c	<<50 ^b	HA	150	wt	+	0.22 (CH/EE 1:5)	+	14.6 + 15.3
 73c	<<50 ^b	DHA	150	A129S	+	0.20 (CHCl ₃ /MeOH 10:1)	+	12.9
 73d	<<50 ^b	HA	150	wt	+	0.34 (CH/EE 1:5)	+	16.5 + 17.0
 73d	<<50 ^b	DHA	150	A129S	+	0.10 (CH/EE 1:5)	+	14.5
 113	100	HA	600	wt	+	0.63 (DCM/MeOH 5:1)	+	19.4
 145	50	HA	150	wt	–	–	–	–
 146	75	HA	225	wt	+	0.26 (CH/EE 1:5)	+	13.4
 147	50	HA	150	wt	–	–	–	–

Tabelle 32. (fortgesetzt)

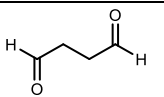
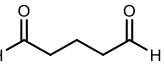
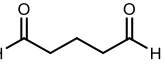
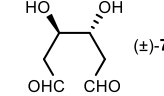
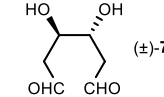
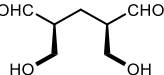
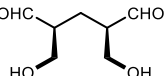
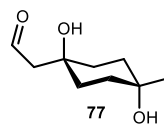
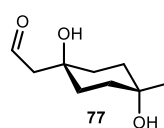
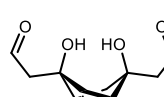
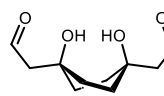
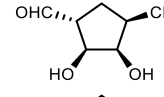
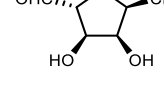
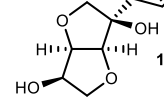
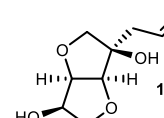
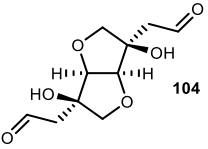
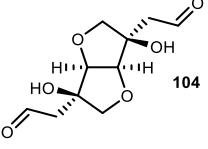
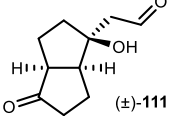
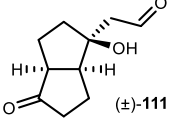
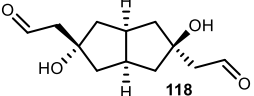
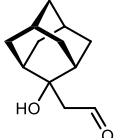
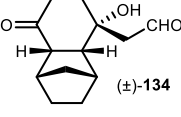
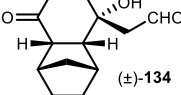
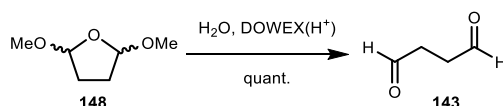
Akzeptor	c _{Akzeptor} ^a [mM]	Donor	c _{Donor} ^a [mM]	FSA [*]	DC ^c	R _f	HPLC ^d	t _R ^e [min]
 143	<<100	HA	600	wt	–	–	–	–
 144	100	HA	600	wt	+	0.06 (CH/EE 1:5)	+	M.S. ^f
 144	100	DHA	600	A129S	+	0.44 (CHCl ₃ /MeOH 5:1)	+	18.3 + 18.6
 (±)-70	100	HA	600	wt	+	0.24 (CHCl ₃ /MeOH 5:1)	+	M.S. ^f
 (±)-70	100	DHA	600	A129S	–	–	–	–
 87a	<<100 ^b	HA	300	wt	–	–	n.b.	n.b.
 87a	<<100 ^b	DHA	300	A129S	–	–	–	–
 77	<<100 ^b	HA	300	wt	(+)	M.S. ^f	–	M.S. ^f
 77	<<100 ^b	DHA	300	A129S	–	–	–	–
 78	<<100 ^b	HA	300	wt	(+)	M.S. ^f	–	–
 78	<<100 ^b	DHA	300	A129S	–	–	–	–
 82	<<100 ^b	HA	300	wt	–	–	–	–
 82	<<100 ^b	DHA	300	A129S	–	–	–	–
 103	<<50 ^b	HA	200	wt	+	0.23 (CHCl ₃ /MeOH 5:1)	+	7.4 + 8.0
 103	<<50 ^b	DHA	200	A129S	–	–	–	–

Tabelle 32. (fortgesetzt)

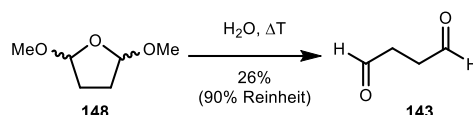
Akzeptor	c _{Akzeptor} ^a [mM]	Donor	c _{Donor} ^a [mM]	FSA*	DC ^c	R _f	HPLC ^d	t _R ^e [min]
	<<25 ^b	HA	100	wt	+	0.23 (CHCl ₃ /MeOH 5:1)	+	M.S. ^f
	<<25 ^b	DHA	100	A129S	–	–	–	–
	<<50 ^b	HA	200	wt	+	0.30 (CHCl ₃ /MeOH 5:1)	+	M.S. ^f
	<<50 ^b	DHA	200	A129S	–	–	–	–
	<<100 ^b	HA	300	wt	–	–	n.b.	n.b.
	<<100 ^b	HA	1000	wt	–	–	n.b.	n.b.
	<<50 ^b	HA	100	wt	+	0.75 (CHCl ₃ /MeOH 5:1)	+	16.4 + 17.4
	<<50 ^b	DHA	100	A129S	–	–	–	–

+: Neuer Fleck (DC) oder neues Signal (HPLC) beobachtet; (+): Verdacht auf neuen Fleck (DC), jedoch kein eindeutiges, diskretes Signal beobachtet; –: Keine Veränderung; n.b.: nicht bestimmt; ^aEndkonzentration; ^bSubstrat aus Stammlösung teilweise präzipitiert/ausgeölt; ^cAnfärbung mit Anisaldehydreagenz. Kontrolle nach 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 und 48 h; ^dDerivatisierung mit *O*-Benzylhydroxylamin und Messung bei 215 nm nach 18, 24 und 48 h; ^ebei Angabe von zwei Zeiten: Isomere des derivatisierten Substrats; ^fmehrere Signale; keines der Signale konnte eindeutig zugeordnet werden.

Bernsteinsäuredialdehyd (143) durch DOWEX(H⁺)-katalysierte Hydrolyse

2,5-Dimethoxytetrahydrofuran (**148**, 130 μL , 1.0 mmol) wurde in H_2O (1 mL) gegeben, mit DOWEX(H⁺) (100 mg) versetzt und 30 min bei 40 °C am Rotationsverdampfer erhitzt. Die Lösung wurde mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 1 mL aufgefüllt, um eine Lösung mit einer Konzentration von $c = 1 \text{ M}$ zu erhalten und wurde ohne weitere Aufreinigung direkt weiterverwendet.

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.16$ (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd).

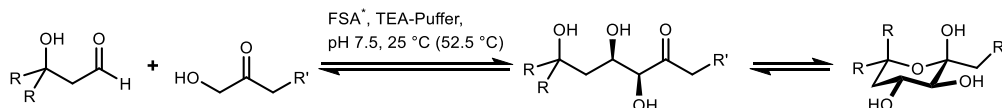
Bernsteinsäuredialdehyd (143)

Synthese nach PELŠS *et al.*^[169]

2,5-Dimethoxytetrahydrofuran (**148**, 15 mL, 115.8 mmol) wurde in H_2O (30 mL) gegeben und für 2.5 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal mit Toluol am Rotationsverdampfer destilliert. Im Anschluss wurde fraktionierend destilliert, wobei eine farblose Flüssigkeit erhalten wurde (2.58 g, 30.0 mmol, 26%).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.16$ (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **Siedebereich:** Sdp. = 85–90 °C (50 mbar).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl_3):**²⁷ $\delta = 9.75$ (s, 2H, H-1, H-4), 2.75 (s, 4H, H-2, H-3) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl_3):** $\delta = 199.8$ (C-1, C-4), 36.0 (C-2, C-3) ppm.

5.4.5 Versuche zu Kapitel 3.2.2



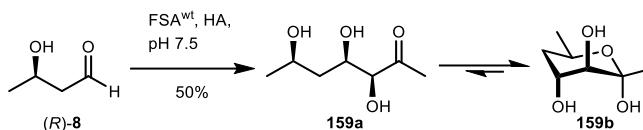
Die Testreaktionen erfolgten nach **AAV3** mit den 3-Hydroxyaldehyden **73a-d**. Die Reaktionen wurden entweder bei 25 °C oder 52.5 °C durchgeführt. Die variierten Reaktionsparameter sind in Tabelle 33 zusammengefasst, wobei 32 individuelle Reaktionen durchgeführt wurden. HPLC-Proben wurden nach 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 und 48 h entnommen.

Tabelle 33. Variierte Reaktionsparameter der FSA⁺-katalysierten Reaktionen bei unterschiedlichen Temperaturen.

Katalysator (Donor)	Akzeptor	Temperatur
FSA ^{wt} (HA)	73a , R = Me	25 °C
FSA ^{A129S} (DHA)	73b , R = Et	52.5 °C
Keiner (HA)	73c , R = $-(\text{CH}_2)_4-$	
Keiner (DHA)	73d , R = $-(\text{CH}_2)_5-$	

²⁷ Im NMR-Spektrum konnte analog zur Literatur ein Anteil an Polymerisierungsprodukt beobachtet werden, welcher durch wiederholte Destillation nicht entfernt werden konnte.

5.4.6 Versuche zu Kapitel 3.2.3 bis 3.2.7

(3*S*,4*R*,6*R*)-3,4,6-Trihydroxyheptan-2-on (159)Synthese nach **AAV4aa****Ansatz:**

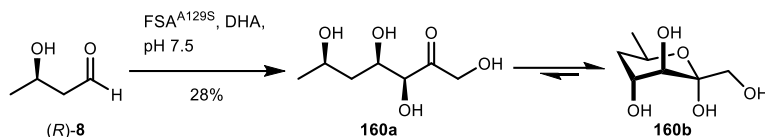
- (*R*)-3-Hydroxybutanal ((*R*)-**8**, 500 mM, 4 mL, 2.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyacetone (1.5 M, 4 mL, 6.00 mmol, 3.00 eq)
- H₂O (12 mL)
- FSA^{wt} (30 mg)
- Reaktionszeit: 70 h

Aufreinigung:

- Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand anschließend an der Lyophilie getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:4) aufgereinigt, wobei **159** als farbloser Feststoff erhalten wurde (162 mg, 1.00 mmol, 50% über 2 Stufen, Produktverhältnis: OK/ β -Anomer/ α -Anomer 44%:<0.1%:56% in D₂O).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.20$ (SiO₂, CH/EE 1:5, Anisaldehyd).
- **HPLC:** $t_{R,(E)} = 11.0$ min, $t_{R,(Z)} = 11.4$ min (Isomere des derivatisierten Substrats).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O):** $\delta = 4.39$ (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, $H\text{-}3_{OK}$), 4.38–4.32 (m, 2H, $H\text{-}4_\alpha$, $H\text{-}4_{OK}$), 4.16–4.13 (m, 1H, $H\text{-}6_\alpha$), 4.10–4.03 (m, 1H, $H\text{-}6_{OK}$), 3.58 (dd, $J = 3.2, 0.5$ Hz, 1H, $H\text{-}3_\alpha$), 2.36 (s, 3H, $H\text{-}1_{OK}$), 1.92 (ddd, $J = 14.1, 8.4, 7.3$ Hz, 1H, $H\text{-}5_{ax,OK}$), 1.84 (ddd, $J = 14.8, 11.5, 3.0$ Hz, 1H, $H\text{-}5_{ax,\alpha}$), 1.75 (ddd, $J = 14.7, 3.0, 0.9$ Hz, 1H, $H\text{-}5_{eq,\alpha}$), 1.75 (ddd, $J = 14.5, 5.5, 0.9$ Hz, 1H, $H\text{-}5_{eq,OK}$), 1.44 (s, 3H, $H\text{-}1_\alpha$), 1.27 (d, $J = 6.3$, 3H, $H\text{-}7_\alpha$), 1.32 (d, 3H, $J = 6.2$, $H\text{-}7_{OK}$) ppm.
- **¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, D₂O):** $\delta = 213.2$ ($C\text{-}2_{OK}$), 98.3 ($C\text{-}2_\alpha$), 79.3 ($C\text{-}3_{OK}$), 69.3 ($C\text{-}4_{OK}$), 68.4 ($C\text{-}3_\alpha$), 68.3 ($C\text{-}6_\alpha$), 65.3 ($C\text{-}6_{OK}$), 61.5 ($C\text{-}4_\alpha$), 41.1 ($C\text{-}5_{OK}$), 33.0 ($C\text{-}5_\alpha$), 25.9 ($C\text{-}1_{OK}$), 24.8 ($C\text{-}1_\alpha$), 22.1 ($C\text{-}7_{OK}$), 20.4 ($C\text{-}7_\alpha$) ppm.
- **HRMS (ESI+):** m/z $[M+Na]^+$ berechnet für $[C_7H_{14}NaO_4]^+$ 185.0784, gef.: 185.0783.

(3*S*,4*R*,6*R*)-1,3,4,6-Tetrahydroxyheptan-2-on (160)Synthese nach **AAV4aa****Ansatz:**

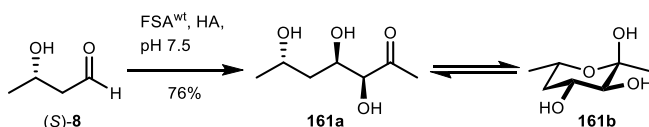
- (*R*)-3-Hydroxybutanal ((*R*)-**8**, 500 mM, 4 mL, 2.00 mmol, 1.00 eq)
- Dihydroxyacetone (1.5 M, 4 mL, 6.00 mmol, 3.00 eq)
- H₂O (12 mL)
- FSAA129S (20 mg)
- Reaktionszeit: 70 h

Aufreinigung:

- Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand anschließend an der Lyophille getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:5 → 1:10) aufgereinigt, wobei **160** als farbloses Feststoff erhalten wurde (100 mg, 0.56 mmol, 28%, 90% Reinheit).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.07$ (SiO₂, CH/EE 1:5, Anisaldehyd).
- **HPLC:** $t_R = 9.3$ min.
- **¹H-NMR, NOESY (300.1 MHz, D₂O):** $\delta = 4.40\text{--}4.31$ (m, 1H, *H*-4), 4.14–4.10 (m, 1H, *H*-6), 3.73 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, *H*-1a), 3.72 (dd, $J = 3.3, 0.9$ Hz, 1H, *H*-3_{eq}), 3.44 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, *H*-1b), 1.85 (ddd, $J = 14.7, 11.6, 3.1$ Hz, 1H, *H*-5_{ax}), 1.75 (ddd, $J = 14.7, 3.0, 0.9$ Hz, 1H, *H*-5_{eq}), 1.24 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, *H*-7) ppm.
- **¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, D₂O):** $\delta = 98.1$ (C-2), 68.1 (C-6), 65.1 (C-3), 64.4 (C-1), 61.3 (C-4), 33.4 (C-5), 20.3 (C-7) ppm.

Die erhaltenen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[61]**(3*S*,4*R*,6*S*)-3,4,6-Trihydroxyheptan-2-on (161)**Synthese nach **AAV4aa****Ansatz:**

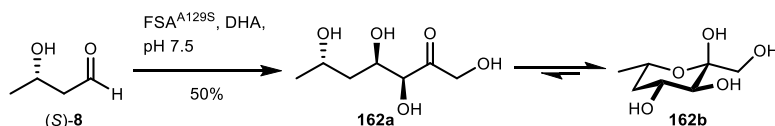
- (*S*)-3-Hydroxybutanal ((*S*)-**8**, 500 mM, 8 mL, 4.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyacetone (1.5 M, 8 mL, 12.00 mmol, 3.00 eq)
- H₂O (24 mL)
- FSA^{wt} (60 mg)
- Reaktionszeit: 41 h

Aufreinigung:

- Zur Reaktionslösung wurde MeOH (20 mL) zugegeben, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand anschließend an der Lyophille getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:4) aufgereinigt, wobei **161** als farbloses Öl erhalten wurde (494 mg, 3.05 mmol, 76%, Produktverhältnis: OK/ β -Anomer/ α -Anomer 3%:87%:10% in D₂O).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.11 (SiO₂, CH/EE 1:5, Anisaldehyd).
- **HPLC:** $t_{R,(E)}$ = 10.1 min, $t_{R,(Z)}$ = 10.8 min (Isomere des derivatisierten Substrats).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O):** δ = 4.37–4.28 (m, 1H, $H_{-4_{OK}}$), 4.27 (d, J = 2.2 Hz, 1H, $H_{-3_{OK}}$), 4.19–4.05 (m, 1H, $H_{-6_{\beta}}$), 4.05–3.96 (m, 1H, $H_{-6_{OK}}$), 3.86 (ddd, J = 11.6, 9.4, 5.1 Hz, 1H, $H_{-4_{\beta}}$), 3.75 (ddd, J = 11.5, 9.7, 5.1 Hz, 1H, $H_{-4_{\alpha}}$), 3.23 (d, J = 9.7 Hz, 1H, $H_{-3_{\alpha}}$), 3.21 (d, J = 9.4 Hz, 1H, $H_{-3_{\beta}}$), 2.05 (ddd, J = 12.8, 5.1, 2.2 Hz, 1H, $H_{-5_{eq,\beta}}$), 1.45 (s, 3H, $H_{-1_{\beta}}$), 1.43–1.25 (m, 1H, $H_{-5_{ax,\beta}}$), 1.19 (d, J = 6.3 Hz, $H_{-7_{\beta}}$), 1.22–1.17 (m, 6H, $H_{-7_{\alpha}}$, $H_{-7_{OK}}$) ppm.
- **¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, D₂O):** δ = 213.0 ($C_{-2_{OK}}$), 99.3 ($C_{-2_{\alpha}}$), 97.9 ($C_{-2_{\beta}}$), 80.2 ($C_{-3_{OK}}$), 78.5 ($C_{-3_{\alpha}}$), 76.8 ($C_{-3_{\beta}}$), 69.0 ($C_{-4_{\alpha}}$), 68.3 ($C_{-4_{OK}}$), 68.0 ($C_{-4_{\beta}}$), 67.0 ($C_{-6_{\alpha}}$), 65.1 ($C_{-6_{\beta}}$), 64.3 ($C_{-6_{OK}}$), 41.6 ($C_{-5_{OK}}$), 40.5 ($C_{-5_{\alpha}}$), 40.3 ($C_{-5_{\beta}}$), 26.0 ($C_{-1_{\alpha}}$), 25.1 ($C_{-1_{\beta}}$), 22.9 ($C_{-1_{OK}}$), 20.6 ($C_{-7_{OK}}$), 20.2 ($C_{-7_{\beta}}$), 17.7 ($C_{-7_{\alpha}}$) ppm.
- **HRMS (ESI+):** m/z [M+Na]⁺ berechnet für [C₇H₁₄NaO₄]⁺ 185.0784, gef.: 185.0784.

(3S,4R,6S)-1,3,4,6-Tetrahydroxyheptan-2-on (162)Synthese nach **AAV4a****Ansatz:**

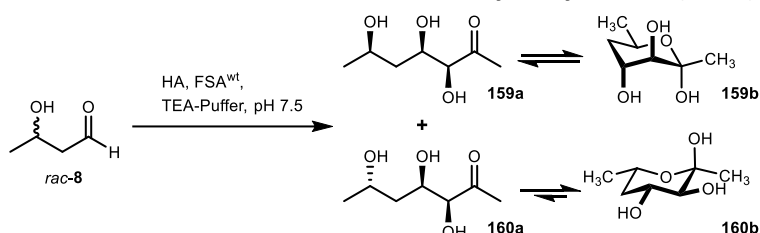
- (S)-3-Hydroxybutanal ((S)-8, 500 mM, 6 mL, 3.00 mmol, 1.00 eq)
- Dihydroxyacetone (1.5 M, 6 mL, 9.00 mmol, 3.00 eq)
- H₂O (18 mL)
- FSA^{A129S} (25 mg)
- Reaktionszeit: 88 h

Aufreinigung:

- Zur Reaktionslösung wurde MeOH (20 mL) zugegeben, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand anschließend an der Lyophille getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:4 → EE) aufgereinigt, wobei **162** als farbloser Feststoff erhalten wurde (270 mg, 1.50 mmol, 50%, Produktverhältnis: OK/ β -Anomer/ α -Anomer <<1%:99%:<<1% in D₂O).

Analytik:

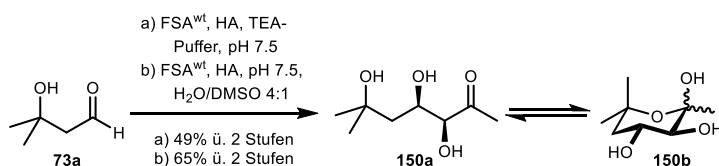
- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.07$ (SiO_2 , CH/EE 1:5, Anisaldehyd).
- **HPLC:** $t_{R,(E)} = 10.1$ min, $t_{R,(Z)} = 10.9$ min (Isomere des derivatisierten Substrats).
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, D_2O):** $\delta = 4.16$ (dq, $J = 11.9, 9.6, 6.3$ Hz, 1H, $H-6$), 3.97 (ddd, $J = 11.6, 9.5, 5.0$ Hz, 1H, $H-4_{ax}$), 3.73 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, $H-1a$), 3.53 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, $H-1b$), 3.46 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, $H-3_{ax}$), 2.09 (ddd, $J = 12.8, 5.0, 2.1$ Hz, 1H, $H-5_{eq}$), 1.41 (ddd, $J = 12.8, 11.9, 11.6$ Hz, $H-5_{ax}$), 1.23 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, $H-7$), ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, D_2O):** $\delta = 97.9$ (C-2), 72.1 (C-3), 68.2 (C-4), 65.3 (C-1), 63.9 (C-6), 40.1 (C-5), 20.0 (C-7) ppm.

Untersuchung der Enantiomeraselektivität von FSA^{wt} für *rac*-3-Hydroxybutanal (*rac*-8)**Ansatz mit einem Verhältnis Donor zu Akzeptor von 3:1**

rac-3-Hydroxybutanal (*rac*-8, 500 mM in D_2O , 150 μL , 75 μmol , 1.0 eq), Hydroxyacetone (1.5 M in D_2O , 150 μL , 225 μmol , 3.0 eq), TEA-Puffer (1 M in D_2O , 37.5 μL , pH 7.5) und D_2O (412.5 μL) wurden in ein NMR-Röhrchen gegeben. Nach der Zugabe von FSA^{wt} (2.25 mg) wurde die Reaktion alle 15 min über einen Zeitraum von 3 h NMR-spektroskopisch bei 500 MHz vermessen.

Ansatz mit einem Verhältnis Donor zu Akzeptor von 1:6

rac-3-Hydroxybutanal (*rac*-8, 500 mM in D_2O , 150 μL , 75 μmol , 1.0 eq), Hydroxyacetone (1.5 M in D_2O , 18.8 μL , 12.5 μmol , 0.5 eq), TEA-Puffer (1 M in D_2O , 37.5 μL , pH 7.5) und D_2O (543.7 μL) wurden in ein NMR-Röhrchen gegeben. Nach der Zugabe von FSA^{wt} (2.25 mg) wurde die Reaktion alle 15 min über einen Zeitraum von 3 h NMR-spektroskopisch bei 500 MHz vermessen.

(3*S*,4*R*)-3,4,6-Trihydroxy-6-methylheptan-2-on (150)

Synthese nach **AAV4a**

Ansatz:

- 3-Hydroxy-3-methylbutanal (**73a**, 500 mM, 2 mL, 1.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyacetone (5 M, 0.6 mL, 3.00 mmol, 3.00 eq)
- H_2O (6.9 mL)
- TEA-Puffer (1 M, 0.5 mL, pH 7.5)
- FSA^{wt} (15 mg)
- Reaktionszeit: 4 d

Aufreinigung:

- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (20 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophille getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:2) aufgereinigt, wobei **150** als farbloses Öl erhalten wurde (86 mg, 0.49 mmol, 49% über 2 Stufen, Produktverhältnis: OK/ β -Anomer/ α -Anomer 85%:15%:<0.1% in D₂O).

Synthese nach **AAV4b****Ansatz:**

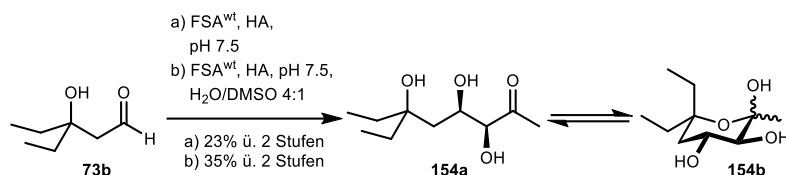
- 3-Hydroxy-3-methylbutanal (**73a**, 500 mM, 6 mL, 3.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyacetone (1.5 M, 4 mL, 6.00 mmol, 2.00 eq)
- H₂O (15.2 mL)
- DMSO (4.8 mL)
- FSA^{wt} (45 mg)
- Reaktionszeit: 4 d

Aufreinigung:

- Das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde anschließend an der Lyophille getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:2) aufgereinigt, wobei **150** als farbloses Öl erhalten wurde (342 mg, 1.94 mmol, 65% über 2 Stufen).

Analytik:

- Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.21$ (SiO₂, CH/EE 1:5, Anisaldehyd).
- HPLC:** $t_{R,(E)} = 12.1$ min, $t_{R,(Z)} = 12.3$ min (Isomere des derivatisierten Substrats).
- ¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O):** $\delta = 4.43$ (ddd, $J = 8.2, 3.9, 2.2$ Hz, 1H, $H-4_{OK}$), 4.31 (dd, $J = 2.2$ Hz, 1H, $H-3_{OK}$), 4.08 (ddd, $J = 11.8, 9.6, 4.7$ Hz, 1H, $H-4_{\beta}$), 3.37 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, $H-3_{\alpha}$), 3.27 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, $H-3_{\beta}$), 2.33 (s, 3H, $H-1_{OK}$), 2.08 (dd, $J = 12.9, 4.7$ Hz, 1H, $H-5_{eq,\beta}$), 1.91–1.77 (m, 2H, $H-5_{OK}$), 1.63 (dd, $J = 12.4, 12.4$ Hz, 1H, $H-5_{ax,\beta}$), 1.46 (s, 3H, $H-7a_{\beta}$), 1.44 (s, 3H, $H-7b_{\beta}$), 1.35 (s, 3H, $H-7a_{OK}$), 1.34 (s, 3H, $H-7b_{OK}$), 1.27 (s, 3H, $H-1_{\beta}$) ppm.
- ¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, D₂O):** $\delta = 213.1$ ($C-2_{OK}$), 99.0 ($C-2_{\beta}$), 80.7 ($C-3_{OK}$), 77.3 ($C-3_{\beta}$), 75.0 ($C-6_{\beta}$), 71.0 ($C-6_{OK}$), 68.8 ($C-4_{OK}$), 65.8 ($C-4_{\beta}$), 44.8 ($C-5_{OK}$), 44.0 ($C-5_{\beta}$), 31.5 ($C-7_{eq,\beta}$), 28.4 ($C-7a_{OK}$), 28.2 ($C-7b_{OK}$), 27.1 ($C-7_{ax,\beta}$), 26.6 ($C-1_{\beta}$), 26.0 ($C-1_{OK}$) ppm.
- HRMS (ESI+):** m/z [M+Na]⁺ berechnet für [C₈H₁₆NaO₄]⁺ 199.0941, gef.: 199.0941.

(3*S*,4*R*)-6-Ethyl-3,4,6-trihydroxyoctan-2-on (154)Synthese nach **AAV4a****Ansatz:**

- 3-Hydroxy-3-methylbutanal (**73b**, 500 mM, 2 mL, 1.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyacetone (5 M, 0.6 mL, 3.00 mmol, 3.00 eq)
- H₂O (6.9 mL)
- TEA-Puffer (1 M, 0.5 mL, pH 7.5)
- FSA^{wt} (15 mg)
- Reaktionszeit: 4 d

Aufreinigung:

- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (20 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophille getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:2) aufgereinigt, wobei **154** als farbloses Öl erhalten wurde (47 mg, 0.23 mmol, 23% über 2 Stufen, Produktverhältnis: OK/ β -Anomer/ α -Anomer 76%:24%:<0.1% in D₂O).

Synthese nach **AAV4b****Ansatz:**

- 3-Hydroxy-3-methylbutanal (**73b**, 500 mM, 6 mL, 3.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyacetone (1.5 M, 4 mL, 6.00 mmol, 2.00 eq)
- H₂O (15.2 mL)
- DMSO (4.8 mL)
- FSA^{wt} (45 mg)
- Reaktionszeit: 4 d

Aufreinigung:

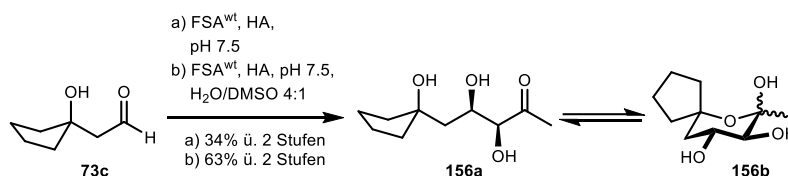
- Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde anschließend an der Lyophille getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:2) aufgereinigt, wobei **154** als farbloses Öl erhalten wurde (215 mg, 1.05 mmol, 35% über 2 Stufen).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.37$ (SiO₂, CH/EE 1:5, Anisaldehyd).
- **HPLC:** $t_{R,(E)} = 15.9$ min, $t_{R,(Z)} = 16.5$ min ((*E*)- und (*Z*)-Isomer des derivatisierten Substrats).

- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, D_2O):** δ = 4.45 (ddd, J = 8.3, 3.9, 2.2 Hz, 1H, $H-4_{\text{OK}}$), 4.34 (d, J = 2.1 Hz, 1H, $H-3_{\text{OK}}$), 4.10 (ddd, J = 11.8, 9.7, 4.7 Hz, 1H, $H-4_{\beta}$), 3.37 (d, J = 9.0 Hz, 1H, $H-3_{\alpha}$), 3.29 (d, J = 9.6 Hz, 1H, $H-3_{\beta}$), 2.36 (s, 3H, $H-1_{\text{OK}}$), 2.10 (dd, J = 14.5, 7.5 Hz, 1H, $H-7a_{\alpha\beta}$), 2.06 (dd, J = 13.2, 4.7 Hz, 1H, $H-5_{\text{eq}\beta}$), 1.89–1.80 (m, 2H, $H-5_{\text{OK}}$), 1.69–1.62 (m, 4H, $H-7a_{\text{OK}}$, $H-7b_{\text{OK}}$), 1.62–1.57 (m, 1H, $H-5_{\alpha\beta}$), 1.51 (s, 3H, $H-1_{\beta}$), 1.50–1.46 (m, $H-2$, $H-7_{\text{eq}\beta}$), 1.37 (d, J = 5.9 Hz, 1H, $H-7b_{\alpha\beta}$), 0.93 (t, J = 7.5 Hz, 6H, $H-8a_{\text{OK}}$, $H-8b_{\text{OK}}$), 0.92–0.86 (m, 6H, $H-8a_{\beta}$, $H-8b_{\beta}$) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, D_2O):** δ = 213.2 ($C-2_{\text{OK}}$), 99.1 ($C-2_{\beta}$), 80.8 ($C-3_{\text{OK}}$), 79.8 ($C-3_{\beta}$), 77.5 ($C-6_{\beta}$), 75.7 ($C-6_{\text{OK}}$), 68.5 ($C-4_{\text{OK}}$), 65.6 ($C-4_{\beta}$), 40.1 ($C-5_{\beta}$), 40.0 ($C-5_{\text{OK}}$), 31.4 ($C-7_{\text{eq}\beta}$), 30.2 ($C-7a_{\text{OK}}$), 30.0 ($C-7b_{\text{OK}}$), 28.7 ($C-7_{\alpha\beta}$), 26.5 ($C-1_{\beta}$), 26.0 ($C-1_{\text{OK}}$), 7.3 ($C-8a_{\text{OK}}$, $C-8a_{\beta}$), 7.0 ($C-8b_{\text{OK}}$), 6.9 ($C-8b_{\beta}$) ppm.
- **HRMS (ESI+):** m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet für $[\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{NaO}_4]^+$ 227.1254, gef.: 227.1254, m/z $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet für $[\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{NaO}_8]^+$ 431.2615, gef.: 431.2615.

(3S,4R)-3,4-Dihydroxy-5-(1-hydroxycyclopentyl)pentan-2-on (156)



Synthese nach **AAV4aa**

Ansatz:

- 2-(1-Hydroxycyclopentyl)acetaldehyd (**73c**, 500 mM, 2 mL, 1.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyaceton (5 M, 0.6 mL, 3.00 mmol, 3.00 eq)
- H₂O (6.9 mL)
- TEA-Puffer (1 M, 0.5 mL, pH 7.5)
- FSAwt (15 mg)
-
- Reaktionszeit: 3 d

Aufreinigung:

- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (10 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophille getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 15:1 → 10:1) aufgereinigt, wobei **156** als farbloses Öl erhalten wurde (69 mg, 0.34 mmol, 34% über 2 Stufen, Produktverhältnis: OK/ β -Anomer/ α -Anomer 51%:45%:4% in D_2O).

Synthese nach **AAV4ab**

Ansatz:

- 2-(1-Hydroxycyclopentyl)acetaldehyd (**73c**, 250 mM 12 mL, 3.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyaceton (1.5 M, 4 mL, 6.00 mmol, 2.00 eq)
- H₂O (10.4 mL)
- DMSO (3.6 mL)
- FSAwt (45 mg)

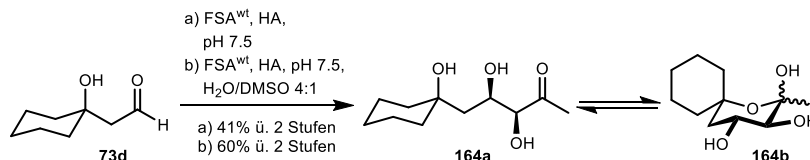
- Reaktionszeit: 4 d

Aufreinigung:

- Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand anschließend an der Lyophille getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:5) aufgereinigt, wobei **156** als farbloses Öl erhalten wurde (384 mg, 1.90 mmol, 63% über 2 Stufen).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.22$ (SiO₂, CH/EE 1:5, Anisaldehyd).
- **HPLC:** $t_{R,(E)} = 14.6$ min, $t_{R,(Z)} = 15.3$ min (Isomere des derivatisierten Substrats).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O):** $\delta = 4.47$ (ddd, $J = 6.7, 5.6, 2.2$ Hz, 1H, $H-4_{OK}$), 4.34 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, $H-3_{OK}$), 4.02 (ddd, $J = 11.8, 9.6, 4.6$ Hz, 1H, $H-4_\beta$), 3.38 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, $H-3_\alpha$), 3.29 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, $H-3_\beta$), 2.34 (s, 3H, $H-1_{OK}$), 2.12 (dd, $J = 12.9, 4.6$ Hz, 1H, $H-5_{eq,\beta}$), 1.99–1.94 (m, 1H, $H-5_{OK}$), 1.89–1.55 (m, 18H, H -Cyclopentyl, $H-5_{ax,\beta}$, $H-5_{OK}$), 1.47 (s, 3H, $H-1_\beta$), 1.43 (s, 3H, $H-1_\alpha$) ppm.
- **¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, D₂O):** $\delta = 213.2$ (C=O _{β}), 99.1 (C-2 _{β}), 84.8 (C-6 _{β}), 82.1 (C-6_{OK}), 80.6 (C-3_{OK}), 77.5 (C-3 _{β}), 69.4 (C-4_{OK}), 66.3 (C-4 _{β}), 42.6 (C-5 _{β}), 42.3 (C-5_{OK}), 41.1, 39.0, 38.9, 37.0, 26.3 (C-1_{OK}), 26.0 (C-1 _{β}), 23.7, 23.1, 22.8, 21.1 ppm.
- **HRMS (ESI+):** m/z [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₀H₁₈NaO₄]⁺ 225.7097, gef.: 225.1094, m/z [2M+Na]⁺ berechnet für [C₂₀H₃₆NaO₈]⁺ 427.2302, gef.: 427.2297.

(3S,4R)-3,4-Dihydroxy-5-(1-hydroxycyclohexyl)pentan-2-on (164)**Synthese nach AAV4a****Ansatz:**

- 2-(1-Hydroxycyclohexyl)acetaldehyd (**73d**, 250 mM, 4 mL, 1.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyaceton (5 M, 1.2 mL, 6.00 mmol, 6.00 eq)
- H₂O (4.5 mL)
- TEA-Puffer (1 M, 0.5 mL, pH 7.5)
- FSA^{wt} (15 mg)
- Reaktionszeit: 4 d

Aufreinigung:

- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (10 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophille getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:2) aufgereinigt, wobei **164** als farbloses Öl erhalten wurde (89 mg, 0.41 mmol, 41% über 2 Stufen, Produktverhältnis: OK/ β -Anomer/ α -Anomer 69%:30%:1% in D₂O).

Synthese nach **AAV4b****Ansatz:**

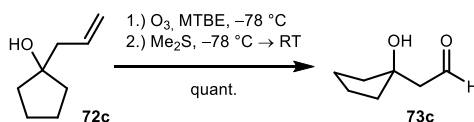
- 2-(1-Hydroxycyclohexyl)acetaldehyd (**73d**, 250 mM, 12 mL, 3.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyacetone (1.5 M, 4 mL, 6.00 mmol, 2.00 eq)
- H₂O (10.4 mL)
- DMSO (3.6 mL)
- FSAwt (45 mg)
- Reaktionszeit: 4 d

Aufreinigung:

- Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand anschließend an der Lyophile getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:2) aufgereinigt, wobei **164** als farbloses Öl erhalten wurde (391 mg, 1.81 mmol, 60% über 2 Stufen).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.34$ (SiO₂, CH/EE 1:5, Anisaldehyd).
- **HPLC:** $t_{R,(E)} = 16.5$ min, $t_{R,(Z)} = 17.0$ min ((*E*)- und (*Z*)-Isomer des derivatisierten Substrats).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O):** $\delta = 4.49$ (ddd, $J = 11.9, 9.7, 4.5$ Hz, 1H, *H*-4_{OK}), 4.31 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, *H*-3_{OK}), 4.06 (ddd, $J = 11.9, 9.6, 4.6$ Hz, 1H, *H*-4_β), 3.29 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, *H*-3_α), 3.19 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, *H*-3_β), 2.36–2.38 (m, 3H, *H*-1_{OK}, *H*-5_{eq,β}), 1.99–1.86 (m, 1H, *H*-5_{OK}), 1.86–1.82 (m, 2H), 1.72–1.33 (m, *H*-Cyclohexyl, *H*-5_{ax,β}) ppm.
- **¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, D₂O):** $\delta = 212.8$ (C-2_{OK}), 99.1 (C-2_β), 80.8 (C-3_{OK}), 77.8 (C-3_β), 77.0 (C-6_β), 72.3 (C-6_{OK}), 68.2 (C-4_{OK}), 65.6 (C-4_β), 42.9 (C-5_{OK}), 41.5 (C-5_β), 40.4, 37.0, 36.7, 35.7, 26.8 (C-1_{OK}), 25.9 (C-1_β), 25.4, 25.1, 22.4, 22.1, 21.9, 21.8 ppm.
- **HRMS (ESI+):** m/z [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₁H₂₀NaO₄]⁺ 239.1254, gef.: 239.1254, m/z [2M+Na]⁺ berechnet für [C₂₂H₄₀NaO₈]⁺ 455.2615, gef.: 455.2611.

1-Hydroxy-cyclopentanacetaldehyd (73c) über Ozonolyse in MTBESynthese nach **AAV2a****Ansatz:**

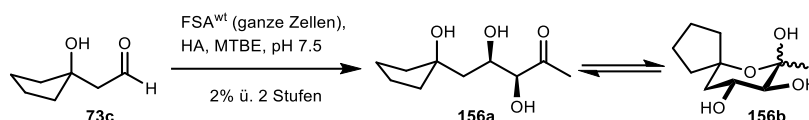
- 1-(2-Propen-1-yl)-cyclopentanol (**72c**, 631 mg, 5.00 mmol, 1.00 eq)
- MTBE (abs., 50 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{50 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{3.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (370 μL, 5.00 mmol, 1.00 eq)

Aufreinigung:

- Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer bei 40 °C (700 mbar) eingengt und die Konzentration (ausgehend von eingesetztem Edukt) auf $c \approx 100$ mM eingestellt.

Analytik:

- Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.50$ und 0.62 (SiO_2 , CH/EE 1:5, Anisaldehyd).

(3S,4R)-3,4-Dihydroxy-5-(1-hydroxycyclopentyl)pentan-2-on (156) über FSA^{wt}-Katalyse mit ganzen Zellen in MTBE

Synthese nach **AAV4a**, hier MTBE verwendet

Ansatz:

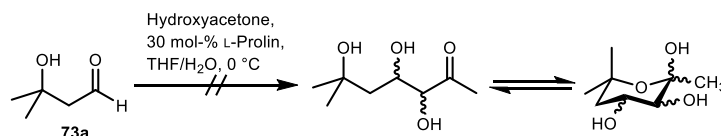
- 2-(1-Hydroxycyclopentyl)acetaldehyd (**72c**, 100 mM in MTBE, 50 mL, 5.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyacetone (700 μL , 10.00 mmol, 2.00 eq)
- TEA-Puffer (1 M, 0.5 mL, pH 7.5)
- FSA^{wt} (ganze Zellen, 350 mg)
- Reaktionszeit: 5 d

Aufreinigung:

- Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:3) aufgereinigt, wobei **156** als farbloses Öl erhalten wurde (19 mg, 0.09 mmol, 2% über 2 Stufen).

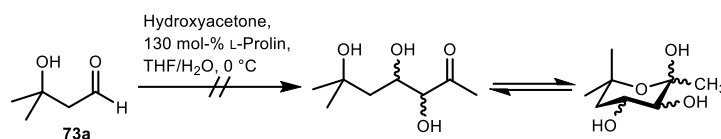
Analytik:

- Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.19$ (SiO_2 , CH/EE 1:5, Anisaldehyd).

3,4,6-Trihydroxy-6-methylheptan-2-on

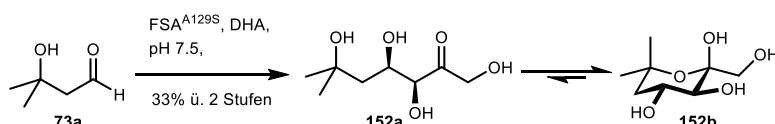
Anlehnung an CHEN *et al.*^[172]

Zu einer 3-Hydroxy-3-methyl-butanal-Lsg. (**73a**, 500 mM, 0.5 mL, 250 μmol , 1.00 eq), Hydroxyacetone (0.5 mL, 6.37 mmol, 25.50 eq) und THF (1 mL) wurde L-Proline (8.6 mg, 30 mol-%, 75 μmol , 0.30 eq) gegeben und 7 d bei 7 °C (Kryostat) gerührt. Mittels Dünnschichtchromatographie wurde kein neuer Spot identifiziert.

3,4,6-Trihydroxy-6-methylheptan-2-on

Anlehnung an CHEN *et al.*^[172]

Zu einer 3-Hydroxy-3-methyl-butanal-Lsg. (**73a**, 500 mM, 0.5 mL, 250 μ mol, 1.00 eq), Hydroxyacetone (0.5 mL, 6.37 mmol, 25.50 eq) und THF (1 mL) wurde L-Prolin (37.4 mg, 130 mol-%, 325 μ mol, 1.30 eq) gegeben und 7 d bei 7 °C (Kryostat) gerührt. Mittels Dünnschichtchromatographie wurde kein neuer Spot identifiziert.

(3S,4R)-1,3,4,6-Tetrahydroxy-6-methylheptan-2-on (152) (ungepuffert)

Synthese nach **AAV4a**

Ansatz:

- 3-Hydroxy-3-methylbutanal (**73a**, 500 mM, 2 mL, 1.00 mmol, 1.00 eq)
- Dihydroxyacetone (1.5 M, 2.0 mL, 3.00 mmol, 3.00 eq)
- H₂O (6 mL)
- FSA^{A129S} (20 mg)
- Reaktionszeit: 70 h

Aufreinigung:

- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (20 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophile getrocknet. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 10:1) aufgereinigt, wobei **152** als farbloses Öl erhalten wurde (63 mg²⁸, 0.33 mmol, 33% über 2 Stufen, Produktverhältnis: OK/ β -Anomer/ α -Anomer <<1%:99%:<<1% in D₂O).

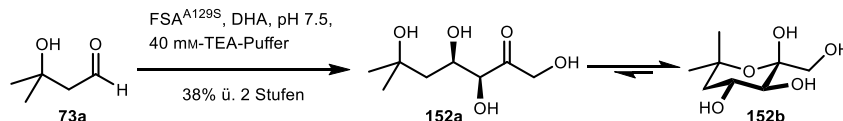
Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.20 (SiO₂, DCM/MeOH 10:1, Anisaldehyd).
- **HPLC:** $t_{R,(E)}$ = 10.0 min, $t_{R,(Z)}$ = 10.6 min ((*E*)- und (*Z*)-Isomer des derivatisierten Substrats).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O):** δ = 4.07 (ddd, 1H, J = 11.9, 9.6, 4.6 Hz, *H*-4), 3.58 (d, 1H, J = 11.6 Hz, *H*-1a), 3.43 (d, 1H, J = 9.7 Hz, *H*-3), 3.32 (d, 1H, J = 11.6 Hz, *H*-1b), 2.00 (dd, 1H, J = 12.9, 4.6 Hz, *H*-5_{eq}), 1.62–1.47 (m, 1H, *H*-5_{ax}), 1.36 (s, 1H, *H*-7a), 1.20 (s, 1H, *H*-7b) ppm.

²⁸ Die isolierte Fraktion enthält neben dem Produkt auch Anteile von DHA und Erythrose. Eine säulenchromatographische Aufreinigung über Kieselgel mit Laufmitteln wie CH/EE, DCM/MeOH und CHCl₃/MeOH sowie eine Aufreinigung über RP18 Kieselgel mit Wasser als Laufmittel ergaben keine Auftrennung des Produktgemisches. Die hier angegebene Ausbeute ist die berechnete Ausbeute.

- **^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, D_2O):** δ = 98.9 (C-2), 75.1 (C-6), 72.2 (C-3), 65.9 (C-4), 64.4 (C-1), 43.7 (C-5), 31.2 (C-7_a), 27.2 (C-7_b) ppm.
- **HRMS (ESI+):** m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet für $[\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NaO}_5]^+$ 215.0890, gef.: 215.0889.

(3*S*,4*R*)-1,3,4,6-Tetrahydroxy-6-methylheptan-2-on (152) (gepuffert)



Synthese nach **AAV4a**

Ansatz:

- 3-Hydroxy-3-methylbutanal (**73a**, 500 mM, 2 mL, 1.00 mmol, 1.00 eq)
- Dihydroxyacetone (1.5 M, 2.0 mL, 3.00 mmol, 3.00 eq)
- H_2O (5.6 mL)
- TEA-Puffer (1 M, 0.4 mL, pH 7.5)
- FSA^{A129S} (20 mg)
- Reaktionszeit: 47 h

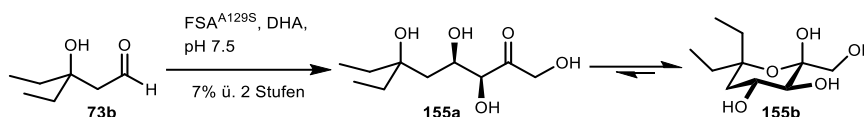
Aufreinigung:

- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (20 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophille getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 10:1) aufgereinigt, wobei **152** als farbloses Öl erhalten wurde (73 mg²⁹, 0.38 mmol, 38% über 2 Stufen).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.33 (SiO_2 , CH/EE 1:5, Anisaldehyd).
- **HPLC:** $t_{R,(E)}$ = 10.0 min, $t_{R,(Z)}$ = 10.6 min (Isomere des derivatisierten Substrats).
- **^1H -NMR (300.1 MHz, D_2O):** δ = 4.08 (ddd, J = 11.6, 9.6, 4.6 Hz, 1H, *H*-4), 3.58 (d, J = 11.6 Hz, 1H, *H*-1_a), 3.44 (d, J = 9.6 Hz, 1H, *H*-3), 3.33 (d, J = 11.6 Hz, 1H, *H*-1_b), 2.01 (dd, J = 13.1, 4.6 Hz, 1H, *H*-5_{eq}), 1.55 (dd, J = 13.1, 11.6 Hz, 1H, *H*-5_{ax}), 1.37 (s, 3H, *H*-7_{ax}), 1.21 (s, 3H, *H*-7_{eq}) ppm.
- **^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, D_2O):** δ = 98.9 (C-2), 75.1 (C-3), 72.2 (C-6), 65.8 (C-4), 64.3 (C-1), 43.7 (C-5), 31.2 (C-7_{eq}), 27.2 (C-7_{ax}) ppm.

²⁹ Siehe Fußnote 28, Seite 183.

(3S,4R)-6-Ethyl-1,3,4,6-tetrahydroxyoctan-2-on (155)

Synthese nach **AAV4a**

Ansatz:

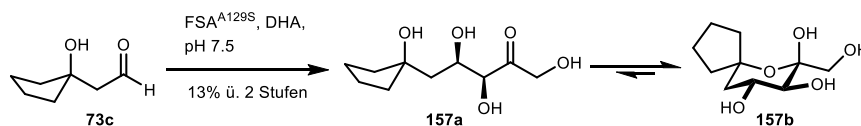
- 3-Ethyl-3-hydroxypentanal (**73b**, 500 mM, 6 mL, 3.00 mmol, 1.00 eq)
- Dihydroxyacetone (1.5 M, 6 mL, 9.00 mmol, 3.00 eq)
- H₂O (18 mL)
- FSA^{A129S} (40 mg)
- Reaktionszeit: 30 d

Aufreinigung:

- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (10 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophile getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 15:1) aufgereinigt, wobei **155** als farbloses Öl erhalten wurde (29 mg³⁰, 0.22 mmol, 7% über 2 Stufen, Produktverhältnis: OK/ β -Anomer/ α -Anomer <<1%:99%:<<1% in D₂O).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.17 (SiO₂, DCM/MeOH 10:1, Anisaldehyd).
- **HPLC:** 13.9 min.
- **¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O):** δ = 4.14 (ddd, 1H, J = 11.9, 9.7, 4.7 Hz, H -4), 3.66 (d, 1H, J = 11.6 Hz, H -1a), 3.50 (d, 1H, J = 9.7 Hz, H -3), 3.47 (d, 1H, J = 11.5 Hz, H -1b), 2.08 (dd, 1H, J = 13.0, 4.7 Hz, H -5_{eq}), 1.72–1.39 (m, 5H, H -5_{ax}, 2x Ethyl) ppm.
- **¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, D₂O):** δ = 98.9 (C -2), 79.9 (C -6), 72.6 (C -3), 65.6 (C -4), 64.5 (C -1), 39.9 (C -5), 31.4, 28.5, 7.5, 6.9 ppm.
- **HRMS (ESI⁺):** m/z [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₀H₂₀NaO₅]⁺ 243.1203, gef.: 243.1202.

(3S,4R)-1,3,4-Trihydroxy-5-(1-hydroxycyclopentyl)pentan-2-on (157)

Synthese nach **AAV4a**

Ansatz:

- 2-(1-Hydroxycyclopentyl)acetaldehyd (**73c**, 250 mM, 12 mL, 3.00 mmol, 1.00 eq)
- Dihydroxyacetone (1.5 M, 6 mL, 9.00 mmol, 3.00 eq)

³⁰ Siehe Fußnote 28, Seite 183.

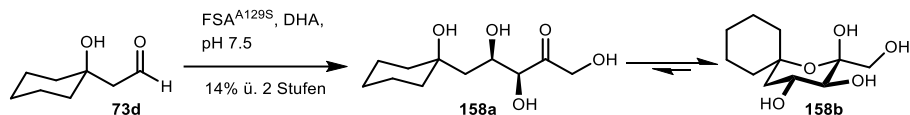
- H₂O (12 mL)
- FSA^{A129S} (40 mg)
- Reaktionszeit: 18 d

Aufreinigung:

- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (10 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophile getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:4) aufgereinigt, wobei **157** als gelbliches Öl erhalten wurde (83 mg³¹, 0.38 mmol, 13% über 2 Stufen, Produktverhältnis: OK/ β -Anomer/ α -Anomer <<1%:99%:<<1% in D₂O).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.20 (SiO₂, CHCl₃/MeOH 10:1, Anisaldehyd).
- **HPLC:** 12.9 min.
- **¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O):** δ = 4.09 (ddd, 1H, *J* = 11.8, 9.7, 4.5 Hz, *H*-4), 3.67 (d, 1H, *J* = 11.6 Hz, *H*-1a), 3.52 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, *H*-3), 3.43 (d, 1H, *J* = 11.5 Hz, *H*-1b), 2.10 (dd, 1H, *J* = 12.9, 4.5 Hz, *H*-5_{eq}), 1.79–1.38 (m, 9H, *H*-5_{ax}, *H*-Cyclopentyl) ppm.
- **¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, D₂O):** δ = 99.0 (C-2), 84.9 (C-6), 72.4 (C-3), 66.5 (C-4), 64.3 (C-1), 42.1 (C-5), 40.8, 37.2, 23.8, 21.3 ppm.
- **HRMS (ESI⁺):** *m/z* [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₀H₁₈NaO₅]⁺ 241.1046, gef.: 241.1043.

(3S,4R)-1,3,4-Trihydroxy-5-(1-hydroxycyclohexyl)pentan-2-on (158)Synthese nach **AAV4a****Ansatz:**

- 2-(1-Hydroxycyclohexyl)acetaldehyd (**73d**, 250 mM, 12 mL, 3.00 mmol, 1.00 eq)
- Dihydroxyacetone (1.5 M, 6 mL, 9.00 mmol, 3.00 eq)
- H₂O (12 mL)
- FSA^{A129S} (25 mg)
- Reaktionszeit: 148 h

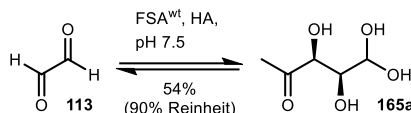
Aufreinigung:

- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (10 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophile getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:4) aufgereinigt, wobei **158** als farbloses Öl erhalten wurde (100 mg³², 0.43 mmol, 14% über 2 Stufen, Produktverhältnis: OK/ β -Anomer/ α -Anomer <<1%:99%:<<1% in D₂O).

³¹ Siehe Fußnote 28, Seite 183.³² Siehe Fußnote 28, Seite 183.

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.10$ (SiO_2 , CH/EE 1:5, Anisaldehyd).
- **HPLC:** 14.5 min.
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, D_2O):** $\delta = 4.07$ (ddd, 1H, $J = 11.4, 9.5, 4.6$ Hz, $H-4$), 3.64 (d, 1H, $J = 11.5$ Hz, $H-1a$), 3.50 (d, 1H, $J = 9.7$ Hz, $H-3$), 3.45 (d, 1H, $J = 11.5$ Hz, $H-1b$), 2.23 (dd, 1H, $J = 13.1, 4.6$ Hz, $H-5_{eq}$), 1.60–1.41 (m, 11H, $H-5_{ax}$, H -Cyclohexyl) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC (75.5 MHz, D_2O):** $\delta = 98.9$ (C-2), 76.8 (C-6), 72.6 (C-3), 65.6 (C-4), 64.4 (C-1), 41.0 (C-5), 40.1, 35.8, 25.3, 22.4, 22.0 ppm.
- **HRMS (ESI+):** m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet für $[\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{NaO}_5]^+$ 255.1203, gef.: 255.1202.

(3S,4S)-3,4,5,5-Tetrahydroxypentan-2-on (165a)**Synthese nach AAV4a****Ansatz:**

- Glyoxal (**113**, 500 mM, 6 mL, 3.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyaceton (1.5 M, 12 mL, 18.00 mmol, 6.00 eq)
- H_2O (12 mL)
- FSA^{wt} (45 mg)
- Reaktionszeit: 72 h

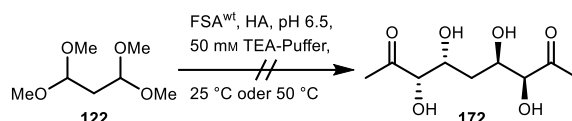
Aufreinigung:

- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (10 mL) versetzt, über Celite® filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophille getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 20:1) aufgereinigt, wobei **165a** als farbloses Öl erhalten wurde (243 mg, 1.62 mmol, 54%, 90% Reinheit³³).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.63$ (SiO_2 , DCM/MeOH 5:1, Anisaldehyd).
- **HPLC:** $t_R = 19.4$ min.
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3):** $\delta = 5.11$ (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, $H-5$), 4.62 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, $H-3$), 3.98 (dd, $J = 7.0, 2.0$ Hz, 1H, $H-4$), 2.35 (s, 3H, $H-1$) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, D_2O):** $\delta = 212.8$ (C-2), 89.7 (C-5), 77.0 (C-3), 73.7 (C-4), 25.7 (C-1) ppm.

³³ Säulenchromatographisch ließ sich das Hydrat **165a** nicht von gebildeten Nebenprodukten trennen. Isoliert wurden 304 mg, nach einer Abschätzung einer Reinheit von 90% ergibt sich 243 mg „Produkt“.

(3*S*,4*R*,6*R*,7*S*)-3,4,6,7-Tetrahydroxynonane-2,8-dion (172)

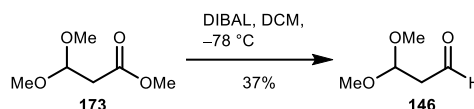
Synthese nach AAV4a

Ansatz:

- 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (**122**, 500 mM, 100 μ L, 50 μ mol, 1.00 eq)
- Hydroxyacetone (1.5 M, 200 μ L, 300 μ mol, 3.00 eq)
- H₂O (175 μ L)
- TEA-Puffer (1 M, 25 μ L, pH 7.5)
- FSA^{wt} (1.5 mg)
- Temperatur: 25 °C oder 50 °C
- Reaktionszeit: 1 d

Analytik:

- Während der Reaktion wurden HPLC-Proben nach 0.5, 1, 2, 4 und 24 h Proben entnommen. Da keine neue Verbindung detektiert wurden, wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet.³⁴

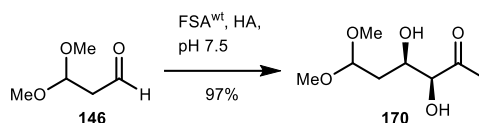
3,3-Dimethoxypropanal (146)

Anlehnung an TROST *et al.*^[214]

Methyl-3,3-dimethoxypropanoat (**173**, 5.00 g, 33.7 mmol, 1.00 eq) wurde in DCM (abs., 130 mL) gegeben und unter Argonatmosphäre auf -78 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurde DIBAL (1 M in Hexan, 59 mL, 59.0 mmol, 1.75 eq) über 20 min zugetropft und im Anschluss bei -78 °C für 1 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MeOH (7.5 mL) beendet, auf Raumtemperatur aufgewärmt und 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurden H₂O (2.5 mL) über 5 min zugetropft, dann Na₂SO₄ (15 g) zugegeben, 15 min gerührt. Die Suspension wurde über eine Glasfritte filtriert und die Lösung im Vakuum bei 40 °C (500 mbar) eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (ⁿPent/Et₂O 2:1) aufgereinigt, wobei **146** als farblose Flüssigkeit erhalten wurde (2.206 g, 17.7 mmol, 37%).

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.21 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **HPLC:** t_R = 18.0 min.
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** δ = 9.69 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, *H*-1), 4.80 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, *H*-3), 3.34 (s, 6H, OCH₃), 2.68 (dd, *J* = 5.5, 2.3 Hz, 2H, *H*-2) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** δ = 170.3 (*C*-1), 101.4 (*C*-3), 53.5 (OCH₃), 51.8 (OCH₃), 38.8 (*C*-2) ppm.

³⁴ Die Abspaltung der Methoxygruppen wurde nicht beobachtet. Als Referenzsignal für die erste Abspaltung wurde das Produkt aus der Reduktion von Methyl-3,3-dimethoxypropanoat (**173**) genommen.

(3S,4R)-3,4-Dihydroxy-6,6-dimethoxyhexan-2-on (170)

Synthese nach **AAV4a**

Ansatz:

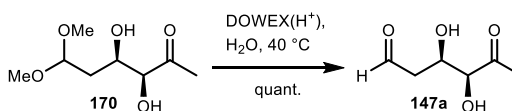
- 3,3-Dimethoxypropanal (**146**, 500 mM, 30 mL, 15.0 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyacetone (1.5 M, 30 mL, 45.0 mmol, 3.00 eq)
- H₂O (90 mL)
- FSA^{wt} (150 mg)
- Reaktionszeit: 2 d

Aufreinigung:

- Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in MeOH aufgenommen, über Celite® filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wobei **170** als gelb-oranges Öl erhalten wurde (2.702 g, 14.1 mmol, 97%, 98% Reinheit³⁵).

Analytik:

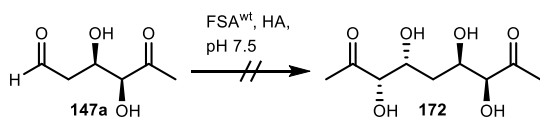
- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.26 (SiO₂, CH/EE 1:5, Anisaldehyd).
- **HPLC:** t_R = 13.4 min.
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** δ = 4.55 (dd, J = 5.4, 5.4 Hz, 1H, H-6), 4.17 (ddd, J = 9.1, 3.6, 2.1 Hz, 1H, H-4), 4.00 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-3), 3.72 (bs, 1H, OH), 3.32 (s, 6H, OCH₃), 2.97 (bs, 1H, OH), 2.22 (s, 3H, H-1), 1.92 (ddd, J = 14.4, 9.1, 5.4 Hz, 1H, H-5a), 1.82 (ddd, J = 14.4, 5.4, 3.6 Hz, 1H, H-5b) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** δ = 208.2 (C-2), 103.6 (C-6), 79.8 (C-3), 68.8 (C-4), 53.8 (OCH₃), 53.8 (OCH₃), 36.3 (C-5), 25.8 (C-1) ppm.

(3R,4S)-3,4-Dihydroxy-5-oxohexanal (147a)

(3S,4R)-3,4-Dihydroxy-6,6-dimethoxyhexan-2-on (**170**, 961 mg, 5.0 mmol) wurde in H₂O (5 mL) aufgenommen, mit DOWEX(H⁺) (200 mg) versetzt und am Rotationsverdampfer bei 40 °C (300 mbar) für 1.5 h rotiert. Im Anschluss wurde die Lösung mit H₂O auf ein Volumen von 5 mL aufgefüllt, sodass eine Lösung mit einer Konzentration von c = 1 M erhalten wurde.

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.22 (SiO₂, CH/EE 1:5, Anisaldehyd).
- **HPLC:** t_{R,1} = 19.5 min, t_{R,1} = 19.8 min (Isomere des derivatisierten Substrats).

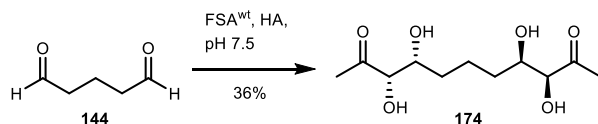
³⁵ Zur Erhöhung der Reinheit kann säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:3) aufgereinigt werden, wobei **170** als schwach gelbliches Öl erhalten wurde (2.092 g, 10.9 mmol, 73%).

(3*S*,4*R*,6*R*,7*S*)-3,4,6,7-Tetrahydroxynonan-2,8-dion (172)Synthese nach **AAV4a****Ansatz:**

- (3*R*,4*S*)-3,4-Dihydroxy-5-oxohexanal (**147a**, 500 mM, 100 μ L, 50 μ mol, 1.00 eq)
- Hydroxyacetone (1.5 M, 100 μ L, 150 μ mol, 3.00 eq)
- H₂O (275 μ L)
- FSA^{wt} (1.5 mg)
- Reaktionszeit: 1 d

Analytik:

- Während der Reaktion wurden HPLC-Proben nach 0.5, 1, 2, 4, 6 und 24 h Proben entnommen. Mittels DC und HPLC wurde keine neue Verbindung detektiert, sodass auf eine weitere Aufreinigung verzichtet wurde.

(3*S*,4*R*,8*R*,9*S*)-3,4,8,9-Tetrahydroxyundecan-2,10-dion (174)Synthese nach **AAV4a****Ansatz:**

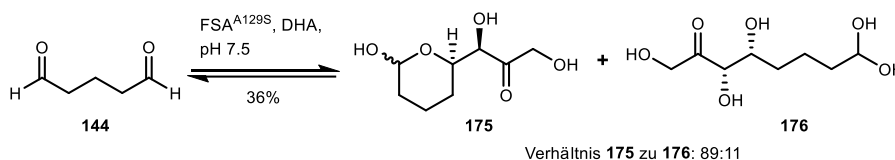
- Glutardialdehyd-Lsg. (**144**, 50 Gew.-% in H₂O, 190 μ L, 1.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyacetone (5 M, 2.4 mL, 6.00 mmol, 6.00 eq)
- H₂O (6.9 mL)
- TEA-Puffer (1 M, 0.5 mL, pH 7.5)
- FSA^{wt} (15 mg)
- Reaktionszeit: 3 d

Aufreinigung:

- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (10 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophile getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 1:4 \rightarrow EE) aufgereinigt, wobei **174** als farbloses Öl erhalten wurde (89 mg, 0.36 mmol, 36%, 90% Reinheit).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.06$ (SiO_2 , CH/EE 1:5, Anisaldehyd).
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, D_2O):** $\delta = 4.35$ (d, $J = 2.2$ Hz, 2H, $H-3$, $H-9$), 4.18 (dt, $J = 7.6, 6.8, 2.2$ Hz, 2H, $H-4$, $H-8$), 2.31 (s, 6H, $H-1$, $H-11$), 1.70–1.38 (m, 6H, $H-5$, $H-6$, $H-7$) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, D_2O):** $\delta = 213.4$ (C-2, C-10), 79.4 (C-3, C-9), 71.3 (C-4, C-8), 32.4 (C-5, C-7), 25.8 (C-1, C-11), 21.5 (C-6) ppm.
- **HRMS (ESI+):** m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet für $[\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{NaO}_6]^+$ 271.1152, gef.: 271.1154.

(1S)-1,3-Dihydroxy-1-((2R)-6-hydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)propan-2-on (175)**Synthese nach AAV4a****Ansatz:**

- Glutardialdehyd-Lsg. (**144**, 50 Gew.-% in H_2O , 800 mg, 4.00 mmol, 1.00 eq)
- Dihydroxyaceton (1.5 M, 16 mL, 24.00 mmol, 6.00 eq)
- H_2O (23.2 mL)
- $\text{FSA}^{\text{A129S}}$ (60 mg)
- Reaktionszeit: 7 d

Aufreinigung:

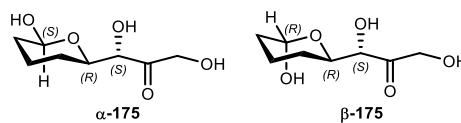
- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (20 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20:1) aufgereinigt, wobei eine Mischung aus **175** und **176** als farbloser kristalliner Feststoff erhalten wurde (**175**: 253 mg, 1.33 mmol, 32%; **176**: 31 mg, 0.15 mmol, 4%, Produktverhältnis: α -Anomer/ β -Anomer/Hydrat 46%:46%:8%).

Analytik:

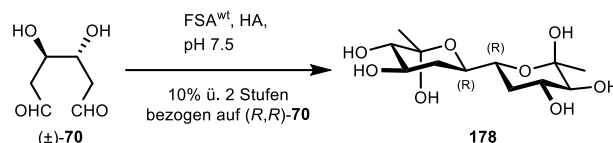
- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.44$ (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5:1, Anisaldehyd).
- **HPLC:** $t_{R,(E)} = 18.3$ min, $t_{R,(Z)} = 18.6$ min ((E) - und (Z) -Isomer des derivatisierten Substrats).
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, Methanol- d_4):**³⁶ $\delta = 5.18$ –5.16 (m, 1H, $H-8_\beta$), 4.62 (dd, $J = 9.6, 2.2$ Hz, 1H, $H-8_\alpha$), 4.56–4.39 (m, 6H, $H-1_\alpha$, $H-1_\beta$, $H-3_H$, $H-8_H$), 4.34 (dt, $J = 11.8, 2.6$ Hz, 1H, $H-4_\beta$), 4.32 (s, 2H, $H-1_H$), 4.14 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, $H-3_\beta$), 4.13 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, $H-3_\alpha$), 3.91–3.88 (m, 1H, $H-4_H$), 3.87 (dt, $J = 10.9, 2.6$ Hz, 1H, $H-4_\alpha$), 1.99–1.87 (m, 2H, $H-6a_\alpha$, $H-6a_\beta$), 1.77–1.68 (m, 2H, $H-5_\chi$, $H-7a_\alpha$), 1.65–1.50 (m, 11H, $H-5_H$, 2x $H-5_\chi$, $H-6a_H$, $H-6b_\alpha$, $H-6b_\beta$, $H-7_\beta$, $H-7_H$), 1.48–1.42 (m, 2H, $H-5_\chi$, $H-6b_H$), 1.32–1.23 (m, 1H, $H-7b_\alpha$) ppm.

³⁶ Die Zuordnung von α/β ist hier ungenau, daher sind die Positionen mit dem Index χ versehen. Signale des Hydrats sind mit „H“ versehen.

- **^{13}C -NMR (75.5 MHz, Methanol- d_4):** δ = 213.7 (C-2_H), 212.9 (C-2_X), 212.7 (C-2_X), 99.8 (C-8_H), 97.7 (C-8_α), 92.7 (C-8_β), 79.2 (C-3_H , C-3_X), 79.0 (C-3), 78.3 (C-4_α), 73.4 (C-4_H), 70.9 (C-4_β), 67.8 (C-1_X), 67.5 (C-1_X), 66.8 (C-1_H), 37.7 (C-7_H), 33.9 (C-5_H), 33.3 (C-7_α), 30.8 (C-7_β), 27.4 (C-5_X), 26.6 (C-5_X), 22.7 (C-6_α), 22.1 (C-6_H), 18.2 (C-6_β) ppm.



(2*R*,2'*R*,4*R*,4'*R*,5*S*,5'*S*)-6,6'-Dimethyloctahydro-2*H*,2'*H*-[2,2'-bipyran]-4,4',5,5',6,6'-hexaol (178)



Synthese nach **AAV4a**

Ansatz:

- *threo*-3,4-Dihydroxyhexandial ((±)-**70**, 500 mM, 2 mL, 1.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyaceton (5 M, 1.2 mL, 6.00 mmol, 6.00 eq)
- H_2O (6.3 mL)
- TEA-Puffer (1 M, 0.5 mL, pH 7.5)
- FSA^{wt} (15 mg)
- Reaktionszeit: 3 d

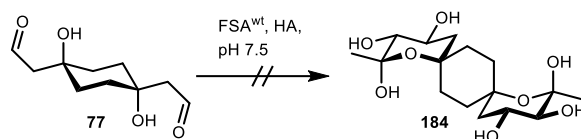
Aufreinigung:

- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (20 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophile getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 15:1 \rightarrow 5:1) aufgereinigt, wobei **178** als farbloses Öl erhalten wurde (16 mg, 0.05 mmol, 10% über 2 Stufen basierend auf (*R,R*)-**70**)³⁷

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.24 (SiO_2 , $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5:1, Anisaldehyd).
- **^1H -NMR (300.1 MHz, D_2O):** δ = 4.00–3.94 (m, 2H, *H-2*, *H-2'*), 3.92 (ddd, J = 11.5, 9.5, 5.1 Hz, 2H, *H-4*, *H-4'*), 3.25 (d, J = 9.5 Hz, 2H, *H-5*, *H-5'*), 2.00 (ddd, J = 12.6, 5.2, 1.8 Hz, 2H, *H-3*_{eq}, *H-3'*_{eq}), 1.68–1.54 (m, 2H, *H-3*_{ax}, *H-3'*_{ax}), 1.50 (s, 6H, 2x CH_3) ppm.
- **^{13}C -NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, D_2O):** δ = 98.0 (*C-6*, *C-6'*), 76.8 (*C-5*, *C-5'*), 69.8 (*C-2*, *C-2'*), 68.2 (*C-4*, *C-4'*), 34.7 (*C-3*, *C-3'*), 24.9 (2x CH_3) ppm.
- **HRMS (ESI+):** m/z [$\text{M}+\text{Na}$]⁺ berechnet für [$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{NaO}_8$]⁺ 317.1207, gef.: 317.1205.

³⁷ Prinzipiell sollten auch das halboffene bzw. doppelt geöffnete (*R,R*)-Enantiomer vorliegen, jedoch konnte nur das doppelt Ringgeschlossene (*R,R*)-Enantiomer isoliert werden. Das (*S,S*)-Enantiomer ist hinsichtlich einer zweifachen Zyklisierung sterisch beeinträchtigt, was eine Isolierung erschwert. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in der Reaktion ebenfalls das (*S,S*)-konfigurierte Produkt entstanden ist.

(3*S*,4*R*,6*R*,9*R*,12*S*,13*R*)-2,11-Dimethyl-1,10-dioxadispiro[5.2.5⁹.2⁶]hexadecane-2,3,4,11,12,13-hexaol (184)

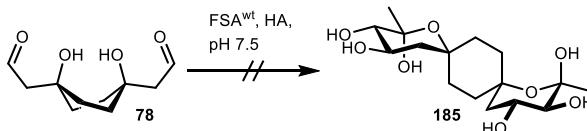
Synthese nach **AAV4a**

Ansatz:

- 2,2'-((1*r*,4*r*)-1,4-Dihydroxycyclohexan-1,4-diyl)diacetaldehyd (**77**, 500 mM, 2 mL, 1.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyacetone (5 M, 1.2 mL, 6.00 mmol, 6.00 eq)
- H₂O (6.3 mL)
- TEA-Puffer (1 M, 0.5 mL, pH 7.5)
- FSAwt (15 mg)
- Reaktionszeit: 3 d

Aufreinigung:

- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (50 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophile getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 10:1 → 5:1) aufgereinigt. In keiner der isolierten Fraktionen wurde das gewünschte Produkt bzw. für das Produkt typische Signale identifiziert.

(3*S*,4*R*,6*S*,9*S*,12*S*,13*R*)-2,11-Dimethyl-1,10-dioxadispiro[5.2.5⁹.2⁶]hexadecane-2,3,4,11,12,13-hexaol (185)

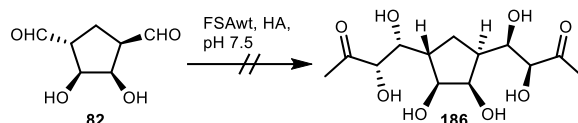
Synthese nach **AAV4a**

Ansatz:

- 2,2'-((1*s*,4*s*)-1,4-Dihydroxycyclohexan-1,4-diyl)diacetaldehyd (**78**, 500 mM, 2 mL, 1.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyacetone (5 M, 1.2 mL, 6.00 mmol, 6.00 eq)
- H₂O (6.3 mL)
- TEA-Puffer (1 M, 0.5 mL, pH 7.5)
- FSA^{wt} (15 mg)
- Reaktionszeit: 3 d

Aufreinigung:

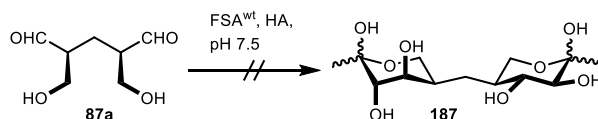
- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (50 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophile getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 10:1 → 5:1) aufgereinigt. In keiner der isolierten Fraktionen wurde das gewünschte Produkt bzw. für das Produkt typische Signale identifiziert.

(3*S*,3'*S*,4*R*,4'*R*)-4,4'-((1*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-4,5-Dihydroxycyclopentan-1,3-diyl)bis(3,4-dihydroxybutan-2-on) (186)Synthese nach **AAV4a****Ansatz:**

- (1*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-4,5-Dihydroxycyclopentan-1,3-dicarbaldehyd (**82**, 500 mM, 2 mL, 1.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyaceton (5 M, 0.6 mL, 3.00 mmol, 3.00 eq)
- H₂O (6.9 mL)
- TEA-Puffer (1 M, 0.5 mL, pH 7.5)
- FSAwt (15 mg)
- Reaktionszeit: 3 d

Aufreinigung:

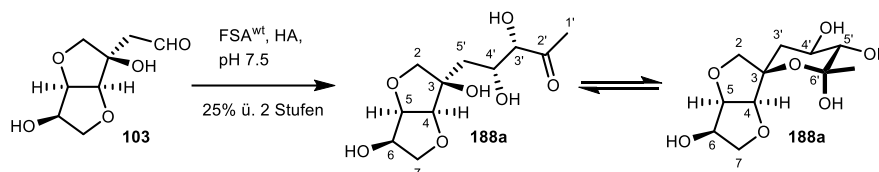
- Mittels DC und HPLC wurde keine neue Verbindung detektiert, sodass auf eine weitere Aufreinigung verzichtet wurde.

(3*S*,4*R*,5*S*)-2-Methyl-5-(((3*R*,4*R*,5*S*)-4,5,6-trihydroxy-6-methyltetrahydro-2*H*-pyran-3-yl)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2,3,4-triol (187)Synthese nach **AAV4a****Ansatz:**

- (3*R*,5*S*)-3,5-Bis(hydroxymethyl)heptandial (**87a**, 500 mM, 2 mL, 1.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyaceton (5 M, 0.6 mL, 6.00 mmol, 3.00 eq)
- H₂O (6.9 mL)
- TEA-Puffer (1 M, 0.5 mL, pH 7.5)
- FSAwt (15 mg)
- Reaktionszeit: 3 d

Aufreinigung:

- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (50 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophile getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 15:1 → 10:1) aufgereinigt. In keiner der isolierten Fraktionen wurde das gewünschte Produkt bzw. für das Produkt typische Signale identifiziert.

(3*S*,4*R*)-5-((3*R*,3*aS*,6*R*,6*aR*)-3,6-Dihydroxyhexahydrofuro[3,2-*b*]furan-3-yl)-3,4-dihydroxypentan-2-on (188)

Synthese nach **AAV4a**

Ansatz:

- 2-((3*R*,3*aS*,6*R*,6*aR*)-3,6-Dihydroxyhexahydrofuro[3,2-*b*]furan-3-yl)acet-aldehyd (**103**, 500 mM, 2 mL, 1.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyacetone (5 M, 0.6 mL, 3.00 mmol, 3.00 eq)
- H₂O (6.9 mL)
- TEA-Puffer (1 M, 0.5 mL, pH 7.5)
- FSAwt (15 mg)
- Reaktionszeit: 3 d

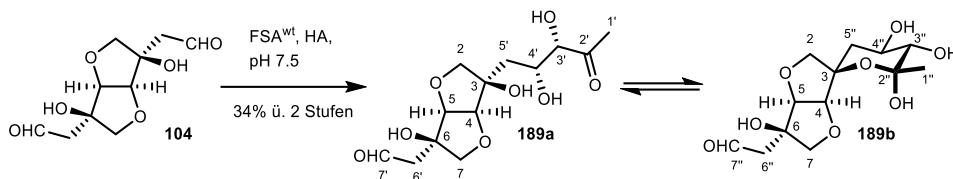
Aufreinigung:

- Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophille getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 15:1) aufgereinigt, wobei **188** als farbloses Öl erhalten wurde (66 mg, 0.25 mmol, 25% über 2 Stufen, Produktverhältnis: OK/ β -Anomer/ α -Anomer 40%:60%:<0.1% in D₂O).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.23$ (SiO₂, CHCl₃/MeOH 5:1, Anisaldehyd).
- **HPLC:** $t_{R,(E)} = 7.4$ min, $t_{R,(Z)} = 8.0$ min ((*E*)- und (*Z*)-Isomer des derivatisierten Substrats).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O):** $\delta = 4.71$ (dd, $J = 4.7, 3.9$ Hz, 1H, *H*-5 β), 4.66 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, *H*-6 β), 4.64 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H, *H*-4 β), 4.60 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, *H*-4 $_{OK}$), 4.56 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, *H*-4' $_{OK}$), 4.52 (ddd, $J = 8.0, 6.5, 4.3$ Hz, 1H, *H*-5 $_{OK}$), 4.48 (ddd, $J = 7.9, 6.6, 5.0$ Hz, 1H, *H*-6 $_{OK}$), 4.36 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, *H*-3' $_{OK}$), 4.13 (dd, $J = 9.1, 6.6$ Hz, 1H, *H*-7 a_{OK}), 4.09 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, *H*-7 a_β), 4.07 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, *H*-4' β), 3.92 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, *H*-2 a_{OK}), 3.83 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, *H*-2 a_β), 3.82 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, *H*-2 b_{OK}), 3.75 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, *H*-2 b_β), 3.71 (dd, $J = 9.1, 7.9$ Hz, 1H, *H*-7 b_{OK}), 3.62 (dd, $J = 9.0, 8.1$ Hz, 1H, *H*-7 b_β), 3.37 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, *H*-5' β), 2.37 (s, 3H, *H*-1' $_{OK}$), 2.26 (dd, $J = 13.5, 5.0$ Hz, 1H, *H*-3 a'_β), 1.99 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, *H*-5' $_{OK}$), 1.83 (dd, $J = 13.5, 11.8$ Hz, 1H, *H*-3 b'_β), 1.56 (s, 3H, CH_{3 β}) ppm.
- **¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, D₂O):** $\delta = 212.8$ (C-2' $_{OK}$), 99.4 (C-6' β), 85.0 (C-4 $_{OK}$), 83.3 (C-4 β), 82.7 (C-5 β), 81.8 (C-6 β), 80.8 (C-3 β), 80.5 (C-3' $_{OK}$), 79.4 (C-3 $_{OK}$), 76.9 (C-2 β), 76.6 (C-5' β), 76.4 (C-2 $_{OK}$), 72.3 (C-5 $_{OK}$), 71.9 (C-7 $_{OK}$), 71.8 (C-6 $_{OK}$), 71.6 (C-7 β), 67.9 (C-4' $_{OK}$), 65.2 (C-4' β), 39.1 (C-3' β), 38.7 (C-5' $_{OK}$), 26.0 (C-1' $_{OK}$), 25.0 (CH_{3 β}) ppm.
- **HRMS (ESI⁺):** m/z [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₁H₁₈NaO₇]⁺ 285.0945, gef.: 285.0944, m/z [2M+Na]⁺ berechnet für [C₂₂H₃₆NaO₁₄]⁺ 547.1996, gef.: 547.1996.

2-((3R,3aS,6R,6aS)-6-((2R,3S)-2,3-dihydroxy-4-oxopentyl)-3,6-dihydroxyhexahydrofuro[3,2-b]furan-3-yl)-acetaldehyde (189)



Synthese nach **AAV4a**

Ansatz:

- 2,2'-((3R,3aS,6R,6aS)-3,6-Dihydroxyhexahydrofuro[3,2-*b*]furan-3,6-diyl)diacetaldehyd (**104**, 500 mm, 2 mL, 1.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyacetone (5 M, 1.2 mL, 6.00 mmol, 6.00 eq)
- H₂O (6.3 mL)
- TEA-Puffer (1 M, 0.5 mL, pH 7.5)
- FSA^{wt} (15 mg)
- Reaktionszeit: 3 d

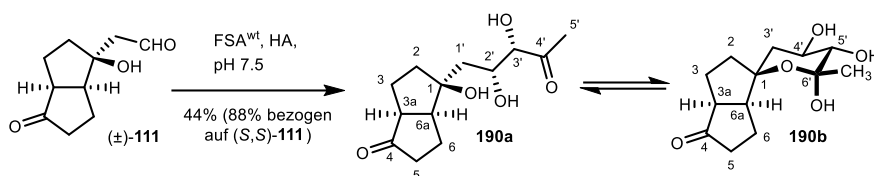
Aufreinigung:

- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (20 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophile getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 15:1 → 5:1) aufgereinigt, wobei **189** als farbloses Öl erhalten wurde (102 mg, 0.34 mmol, 34% über 2 Stufen, 90% Reinheit, Produktverhältnis: OK/ β -Anomer/ α -Anomer 44%:28%:28% in D₂O).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.23 (SiO₂, CHCl₃/MeOH 5:1, Anisaldehyd).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O):**³⁸ δ = 9.79 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, *H*-7'_{OK}), 4.34 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, *H*-3'_{OK}), 3.36 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, *H*-3' _{α}), 3.35 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, *H*-3' _{β}), 2.90 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, *H*-6'_{OK}), 2.89 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, *H*-6' _{α} , *H*-6' _{β}), 2.35 (s, 3H, *H*-1_{OK}), 2.23 (dd, *J* = 13.5, 5.1 Hz, 1H, *H*-5' _{α}), 2.21 (dd, *J* = 13.5, 5.1 Hz, 1H, *H*-5' _{β}), 1.81 (dd, *J* = 13.5, 5.1 Hz, 1H, *H*-5' _{α}), 1.79, 1.54 (s, 3H, *H*-1' _{α} , *H*-1' _{β}) ppm.
- **¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, D₂O):** δ = 212.8 (C-2_{OK}), 204.6 (C-7_{OK}, C-7 _{β}), 99.5 (C-2 _{β}), 67.9 (C-6_{OK}), 65.2 (C-6 _{β}), 48.8 (C-5_{OK}), 48.7 (C-5 _{β}), 26.0 (C-1_{OK}), 25.0 (C-1 _{β}) ppm.

³⁸ Das Produkt konnte nicht als Reinstoff isoliert werden. Im ¹H-NMR-Bereich von 4.7 bis 4.5 ppm und 4.1 bis 3.7 ppm und im ¹³C-NMR-Bereich von 88 bis 75 ppm befinden sich zu viele Signale, sodass diese nicht eindeutig von Nebenprodukten auseinandergehalten werden können und hier nur die Signale angegeben sind, welche eindeutig zuzuordnen sind. Der Leser sei auf den Spektrenvergleich des Produkts zu **188** in der Diskussion (Siehe Seite 92) hingewiesen.

(3a*S*,4*S*,6a*S*)-4-((2*R*,3*S*)-2,3-Dihydroxy-4-oxopentyl)-4-hydroxyhexahydropentalen-1(2*H*)-on (190)

Synthese nach **AAV4a**

Ansatz:

- (±)-2-((1*S*,3a*S*,6a*S*)-1-Hydroxy-4-oxooctahydropentalen-1-yl)acetaldehyd ((±)-**111**, 500 mm, 4 mL, 2.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyacetone (5 M, 1.2 mL, 6.00 mmol, 3.00 eq)
- H₂O (13.8 mL)
- TEA-Puffer (1 M, 1 mL, pH 7.5)
- FSA^{wt} (30 mg)
- Reaktionszeit: 3 d

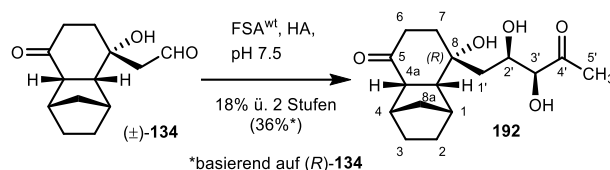
Aufreinigung:

- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (20 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophile getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 15:1) aufgereinigt, wobei **190** als gelbliches Öl erhalten wurde (225 mg, 0.88 mmol, 44% über 2 Stufen, Produktverhältnis: OK/β-Anomer/α-Anomer 44%:8%:48% in D₂O).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.30 (SiO₂, CHCl₃/MeOH 5:1, Anisaldehyd).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O):**³⁹ δ = 4.43 (dt, *J* = 9.4, 2.5 Hz, 1H, *H*-2'_{OK}), 4.33 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, *H*-3'_{OK}), 4.02 (ddd, *J* = 11.8, 9.7, 4.8 Hz, 1H, *H*-4'_β), 3.32 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, *H*-5'_α), 3.28 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, *H*-5'_β), 2.96–2.80 (m, 2H, *H*-3a_χ), 2.68 (ddd, *J* = 10.1, 8.3, 2.0 Hz, 1H, *H*-6a_χ), 2.56–2.31 (m, 5H, 2x *H*-5_χ, 2x *H*-6_χ, *H*-6a_χ), 2.33 (s, 3H, *H*-5'_{OK}), 2.13–1.91 (m, 8H, *H*-1'_{OK}, 2x *H*-2_χ, 4x *H*-3_χ, *H*-3'_β), 1.90–1.72 (m, 7H, *H*-1'_{OK}, 2x *H*-2_χ, *H*-3'_β, 2x *H*-5_χ, *H*-6_χ), 1.62–1.50 (m, 1H, *H*-6_χ), 1.39 (s, 3H, CH_{3,β}) ppm.
- **¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, D₂O):** δ = 232.1 (*C*-4_χ), 231.2 (*C*-4_χ), 213.0 (*C*-4'_{OK}), 98.8 (*C*-6'_β), 84.6 (*C*-1_β), 82.3 (*C*-1_{OK}), 81.0 (*C*-3'_{OK}), 77.5 (*C*-5'_β), 68.4 (*C*-2'_{OK}), 66.5 (*C*-4'_β), 52.2 (*C*-6a_χ), 51.2 (*C*-3a_χ), 51.1 (*C*-6a_χ), 50.4 (*C*-3a_χ), 40.8 (*C*-1'_{OK}), 39.2 (*C*-3'_β), 38.2 (*C*-5_χ), 37.9 (*C*-5_χ), 37.8 (*C*-6_χ), 36.4 (*C*-6_χ), 26.4 (CH_{3,β}), 25.9 (*C*-5'_{OK}), 24.9 (*C*-2_χ), 24.6 (*C*-2_χ), 19.3 (*C*-3_χ), 19.0 (*C*-3_χ) ppm.
- **HRMS (ESI+):** *m/z* [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₃H₂₀NaO₅]⁺ 279.1203, gef.: 279.1201.

³⁹ Signale, die nicht eindeutig zwischen dem β-Anomer bzw. der Offenen Kette unterschieden werden können, sind hier mit dem Index χ versehen.

(1*R*,4*S*,4*aS*,8*R*,8*aR*)-8-((2*R*,3*S*)-2,3-Dihydroxy-4-oxopentyl)-8-hydroxyoctahydro-1,4-methanonaphthalen-5(1*H*)-on (192)Synthese nach **AAV4a****Ansatz:**

- 3-Hydroxyaldehyd (±)-**134** (250 mM, 12 mL, 3.00 mmol, 1.00 eq)
- Hydroxyaceton (1.5 M, 6 mL, 9.00 mmol, 3.00 eq)
- H₂O (12 mL)
- FSA^{wt} (45 mg)
- Reaktionszeit: 8 d

Aufreinigung:

- Die Reaktionslösung wurde mit MeOH (10 mL) versetzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde anschließend an der Lyophile getrocknet. Der erhaltene zähe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 40:1) aufgereinigt, wobei **192** als farbloses Öl erhalten wurde (162 mg, 0.55 mmol, 18% über 2 Stufen, Produktverhältnis: OK/β-Anomer/α-Anomer >99%:<0.1%:<0.1% in D₂O).

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.75$ (SiO₂, CHCl₃/MeOH 5:1, Anisaldehyd).
- **Schmelzbereich:** Smp: 120–122 °C.
- **HPLC:** $t_{R,(E)} = 16.4$ min, $t_{R,(Z)} = 17.4$ min (Isomere des derivatisierten Substrats).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):**⁴⁰ $\delta = 4.33$ (d, $J = 10.9, 2.5$ Hz, 1H, *H*-2'), 3.99 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, *H*-3'), 2.57–2.54 (m, 1H, *H*-1), 2.49–2.44 (m, 3H, *H*-4, *H*-4a), 2.44–2.39 (m, 1H, *H*-6a), 2.24 (s, 3H, *H*-5'), 2.27–2.21 (m, 1H, *H*-6b), 2.20–2.04 (m, 4H, *H*-3a, *H*-7a, *H*-8a), 2.07 (dd, $J = 14.9, 10.9$ Hz, 1H, *H*-1'a), 1.82 (dt, $J = 13.7, 8.4$ Hz, 1H, *H*-7b), 1.60 (d, $J = 14.9, 2.5$ Hz, 1H, *H*-1'b), 1.49–1.41 (m, 1H, *H*-2a), 1.41–1.32 (m, 1H, *H*-2b), 1.27–1.21 (m, 2H, CH₂), 1.21–1.14 (m, 1H, *H*-3b) ppm.
- **¹³C-NMR, HSQC, HMBC (75.5 MHz, CDCl₃):** $\delta = 214.2$ (C-5), 209.1 (C-4'), 80.4 (C-3'), 72.9 (C-8), 69.2 (C-2'), 51.3 (C-4a), 50.4 (C-8a), 41.6 (C-1'), 40.2 (CH₂), 40.1 (C-4), 39.2 (C-1), 36.1 (C-6), 33.2 (C-7), 26.3 (C-5'), 24.5, 23.5 ppm.
- **HRMS (ESI+):** m/z [M+Na]⁺ berechnet für [C₁₆H₂₄NaO₅]⁺ 319.1516, gef.: 319.1517, m/z [2M+Na]⁺ berechnet für [C₃₂H₄₈NaO₁₀]⁺ 615.3140, gef.: 615.3143.

⁴⁰ Es ist ungeklärt, welches der beiden Enantiomere umgesetzt wurde. Eine Zuordnung ist schwierig, da der gebildete Zucker in Lösung fast vollständig offenkettig vorliegt und somit eine Zuordnung zu einem von zwei möglichen Produkten anhand von Kopplungskonstanten erschwert ist. Da aus dem Rohprodukt nur 1 Satz an ¹³C-Signalen beobachtet wurde, ist darauf zu schließen, dass nur ein Produkt gebildet wurde (Kapitel 3.2.7.2).

5.4.7 Versuche zu Kapitel 3.2.8

Die Testreaktionen wurden nach **AAV5** durchgeführt. Die Ansatzmengen und analytischen Ergebnisse sind in Tabelle 34 zusammengefasst.

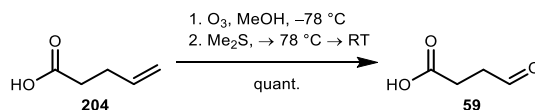
Tabelle 34. Screening von DERA^{F200I} und FSA^{D6H} auf Aktivität mit linearen Dialdehyden und Aceton.

n	C _{Akzeptor} ^a [mM]	C _{Donor} ^a [mM]	Katalysator	DC ^b	HPLC ^c
0	50	150	DERA ^{F200I}	–	–
0	50	150	FSA ^{D6H}	–	–
2 ^d	50	150	DERA ^{F200I}	–	–
2 ^d	50	150	FSA ^{D6H}	–	–
3	50	150	DERA ^{F200I}	–	–
3	50	150	FSA ^{D6H}	–	–
„4“ ^e	50	150	DERA ^{F200I}	–	–
„4“ ^e	50	150	FSA ^{D6H}	–	–

^aEndkonzentration; ^bAnfärbung mit Anisaldehydreagenz; ^cKontrolle nach 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 h; ^dDie Testreaktion wurde jeweils mit einer Stammlösung von Bernsteinsäuresealdehyd aus der Reaktion mit DOWEX(H⁺) sowie als Reinsubstanz nach der Destillation durchgeführt; ^e(±)-3,4-Dihydroxyhexandial ((±)-**70**).

5.4.8 Versuche zu Kapitel 4.1

5.4.8.1 Versuche zu Kapitel 4.1.1

4-Oxobutansäure (**59**) durch Ozonolyse

Synthese nach **AAV2a**

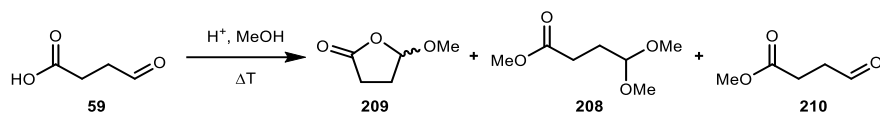
Ansatz:

- 4-Pentensäure (**204**, 14.1 mL, 140.0 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 200 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{250 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{8.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (21. mL, 289 mol, 2.05 eq)
- Konzentration auf c ≈ 630 mM eingestellt

Analytik:

- **HPLC:** t_R = 14.3 min.

Testreaktionen zur pTsOH-katalysierten Umsetzung von BSA (59) mit Methanol



Bei den Testreaktionen wurde 1 mL der OzonolyseLösung mit BSA (59, 0.63 mmol, 1.00 eq) eingesetzt. Als Reaktionsparameter wurden verschiedene Äquivalente des Katalysators *para*-Toluolsulfonsäure (als Monohydrat und in essigsaurer Lösung), die Reaktionstemperatur, die An- oder Abwesenheit von Molekularsieb (3Å) und/oder Orthoameisensäuretrimethylester variiert. Die Parameter für die Testreaktionen sind in Tabelle 35 zusammengefasst, wobei 32 individuelle Reaktionen durchgeführt wurden.

Tabelle 35. Variierte Reaktionsparameter für die saure Methanolyse von BSA (59).

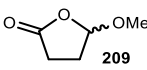
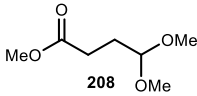
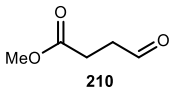
Katalysator	CH(OCH ₃) ₃	Molekularsieb (3Å)	Temperatur
0.05 eq	0 eq	mit	25 °C
0.10 eq	1.10 eq	ohne	50 °C

Für Tests mit Molekularsieb wurde der Lösung eine kleine Menge an Molekularsieb (3Å) zugesetzt. Für Tests mit Orthoameisensäuretrimethylester wurden der Lösung jeweils 74 mg (0.69 mmol, 1.10 eq) zugesetzt. Der Katalysator *para*-Toluolsulfonsäure wurde entweder als Lösung (12 Gew.-% in AcOH, 45 mg, 32 µmol, 0.05 eq oder 90 mg, 63 µmol, 0.10 eq) oder als Monohydrat (6 mg, 32 µmol, 0.05 eq oder 12 mg, 63 µmol, 0.10 eq) zugesetzt. Die Reaktionsmischungen wurden entweder bei 25 °C oder bei 50 °C durchgeführt. Nach 20 min, 1 h und 2 h wurden die Reaktionen mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Nach zwei Stunden wurden GC-Proben genommen.

Synthese im quantitativen Maßstab

Zur Reaktionslösung aus der Ozonolyse (enthält 502.0 mmol BSA (59)) wurde *para*-Toluolsulfonsäure (4.76 g, 25.0 mmol, 0.05 eq) zugegeben und die Reaktionsmischung für 3.5 h unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand über eine kurze Glasfritte mit Kieselgel (0.060–0.200 mm) filtriert und mit wenig CH₂Cl₂ (2:1) nachgespült. Das Filtrat wurde im Vakuum eingedampft und anschließend fraktionierend destilliert.

Tabelle 36. Inhalt der Destillationsfraktionen der sauren Umsetzung von BSA (59) in Methanol. Die Anteile sind jeweils aus den Integralen der Signale im ¹H-NMR-Spektren entnommen.

Frak.	Siede- bereich	Gemisch ⁴¹							
		m [g]	n [mmol]	m [g]	n [mmol]	m [g]	n [mmol]	m [g]	n [mmol]
1	50–55 °C [16 mbar]	5.69	41.3	3.15	19.4	1.17	10.1	1.37	11.8
2	73–74 °C [11 mbar]	40.50	303.4	18.45	113.1	14.39	124.2	7.66	66.1
Σ(1+2)		46.19	344.7	21.60	132.5	15.56	134.3	9.03	77.9

⁴¹ Der Anteil an DMSO in den Destillationsfraktionen ist in der Tabelle nicht aufgeführt (Fraktion 1: 2.55 g DMSO, Fraktion 2: 17.52 g DMSO).

- **GC:** $t_R(\mathbf{210}) = 8.8$ min; $t_R(\mathbf{209}) = 10.2$ min; $t_R(\mathbf{208}) = 10.5$ min.
- **HPLC:** $t_R(\mathbf{210}) = 16.1$ min.
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, D_2O):** **209:** $\delta = 4.58$ (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, $H-4$), 3.43 (s, 3H, OCH_3), 2.47 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $H-2$), 1.95 (dt, $J = 7.4, 5.5$ Hz, 2H, $H-3$) ppm; **208:** $\delta = 5.11$ (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, $H-4$), 3.76 (s, 6H, 2x OCH_3), 3.43 (s, 3H, CO_2CH_3), 2.56 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $H-2$), 1.99 (dt, $J = 7.5, 5.6$ Hz, 2H, $H-3$) ppm; **210:** $\delta = 9.76$ (t, $J = 0.5$ Hz, 1H, $H-4$), 3.76 (s, 3H, CO_2CH_3), 2.94 (dt, $J = 6.5, 0.5$ Hz, 2H, $H-3$), 2.74 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, $H-2$) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, D_2O):** **209:** $\delta = 175.6$ (C-1), 104.3 (C-4), 53.7 (OCH_3), 28.9 (C-2), 27.6 (C-3) ppm; **208:** $\delta = 176.5$ (C-1), 90.1 (C-4), 55.2 (CO_2CH_3), 53.7 (2x OCH_3), 32.3 (C-3), 29.3 (C-2) ppm; **210:** $\delta = 205.7$ (C-4), 176.3 (C-1), 52.4 (CO_2CH_3), 38.1 (C-3), 26.3 (C-2) ppm.

Hydrolysereaktionen der Reaktionsgemische

Zu einem Gemisch aus 5-Methoxydihydrofuran-2(3H)-on (**209**), Methyl 4,4-dimethoxybutanoat (**208**) und Methyl-4-oxobutanoat (**210**) wurde H_2O zugegeben und 3 h unter Rückfluss erhitzt (Details siehe Tabelle 37). Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels NMR-Spektroskopie untersucht.

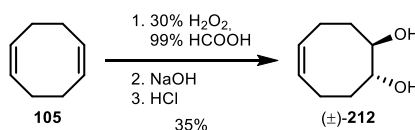
Tabelle 37. Reaktionsbedingungen und Beobachtungen der Hydrolysreaktionen.

#	Gemisch aus 208, 211 und 212				H_2O		DOWEX(H^+)	pTsOH	Beobachtete Produkte im NMR
	n_{209}^b [mmol]	n_{208}^b [mmol]	n_{210}^b [mmol]	Σn [mmol]	n [mmol]	V [mL]	m [mg]	m [mg]	
1	11.8	6.2	7.2	25.2	25.2	0.45	–	–	208 und 210
2	10.9	8.3	6.5	25.7	25.7	4.60	–	–	208 und 210
3	9.8	10.0	5.7	26.2	26.2	4.70	500	–	59^d
4	9.8	10.7	5.7	26.2	26.2	4.70	–	250	208^c, 210^c und 59^d

^aEs wurden Fraktionen aus der Destillation mit unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet; ^bMolmenge bestimmt durch NMR-Spektroskopie; ^cin geringen Mengen beobachtet; ^dals Hydrat **213**.

5.4.8.2 Versuche zu Kapitel 4.1.2

cis-5-Cycloocten-*trans*-1,2-diol ((±)-**212**)



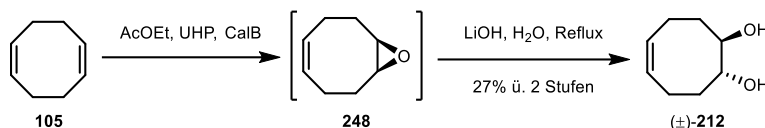
trans-Dihydroxylierung nach YATES *et al.* ^[189]

In einen 1 L-Dreihalsrundkolben, ausgestattet mit einem Thermometer und einem Tropftrichter (500 mL), wurde 1,5-Cyclooctadien (**105**, 50.00 g, 0.46 mol, 1.00 eq) gegeben und auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren wurde über den Tropftrichter eine Mischung aus Wasserstoffperoxid (30% in Wasser, 55 mL, 0.50 mol, 1.09 eq) und Ameisensäure (99%, 310 mL) so zugetropft, dass die Reaktionstemperatur zwischen 40–45 °C gehalten wurde (ca. 60 min). Nach vollständiger Zugabe wurde für weitere 5 min bei 40–45 °C gerührt, anschließend der Tropftrichter gegen einen Dimrothkühler ausgetauscht und die Reaktionsmischung für 2 h auf 65 °C erhitzt, bis ein Iod-Stärke-Test auf Peroxide negativ ausfällt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum bei 60 °C entfernt und der Rückstand vorsichtig mit NaOH (28.00 g, 0.70 mol) in H_2O (120 mL) versetzt, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und dann für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wurde die Lösung mit HCl

(konz., ca. 6 mL) neutralisiert, im Vakuum eingengt und der Rückstand dreimal mit DCM (je 150 mL) extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene braune Öl wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 4:1 \rightarrow CH/EE 1:1) aufgereinigt, wobei (\pm)-**212** als schwach gelbliches Öl erhalten wurde (22.26 g, 0.16 mol, 35%).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.18$ (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **^1H -NMR (300.1 MHz, CDCl_3):** $\delta = 5.62\text{--}5.51$ (m, 2H, *H*-4, *H*-5), 3.73–3.65 (m, 2H, *H*-1, *H*-8), 3.40 (bs, OH), 2.39–2.26 (m, 2H, *H*-3, *H*-6), 2.17–2.02 (m, 4H, *H*-2a, *H*-3, *H*-6, *H*-7a), 1.62–1.50 (m, 2H, *H*-2b, *H*-7b) ppm.
- **^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3):** $\delta = 129.2$ (C-4, C-5), 74.0 (C-1, C-8), 33.5 (C-2, C-7), 22.8 (C-3, C-6) ppm.

cis-5-Cycloocten-trans-1,2-diol ((\pm)-212**)**

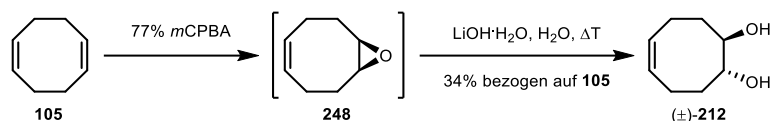


Epoxidierung nach ANKUDEY *et al.*^[215]; Epoxidöffnung nach LI *et al.*^[216]

1,5-Cyclooctadien (**105**, 4.33 g, 40.0 mmol, 1.00 eq) wurde in EE (60 mL) gegeben. Zu der Lösung wurden Harnstoff-Wasserstoffperoxid-Addukt (UHP, 3.95 g, 42.0 mmol, 1.05 eq) und CalB (2.00 g, immobilisiert) gegeben und die Reaktionsmischung für 3 d bei 25 °C geschüttelt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend filtriert, mit wenig EE gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 2:1) aufgereinigt.⁴² Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in H_2O (110 mL) aufgenommen, mit LiOH (2.87 g, 120.0 mmol, 3.00 eq bezogen auf **248**) versetzt und für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 2:1) aufgereinigt, wobei (\pm)-**212** als schwach gelbes Öl erhalten wurde (1.54 g, 10.8 mmol, 27% über 2 Stufen).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.18$ (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **^1H -NMR (300.1 MHz, CDCl_3):** $\delta = 5.62\text{--}5.51$ (m, 2H, *H*-4, *H*-5), 3.67–3.58 (m, 2H, *H*-1, *H*-8), 3.34 (bs, OH), 2.39–2.26 (m, 2H, *H*-3, *H*-6), 2.16–2.02 (m, 4H, *H*-2a, *H*-3, *H*-6, *H*-7a), 1.60–1.49 (m, 2H, *H*-2b, *H*-7b) ppm.
- **^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3):** $\delta = 129.2$ (C-4, C-5), 73.9 (C-1, C-8), 33.4 (C-2, C-7), 22.8 (C-3, C-6) ppm.

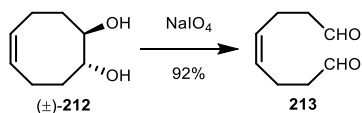
⁴² Da das Epoxid **248** leicht flüchtig war, wurde das Lösungsmittel nicht vollständig entfernt, sodass Lösungsmittelreste in den jeweiligen NMR-Spektren verblieben. Analytik des Epoxids **248**: $R_f = 0.91$ (SiO_2 , CH/EE 2:1, Anisaldehyd); ^1H -NMR (300.1 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.61\text{--}5.51$ (m, 2H, *H*-4, *H*-5), 3.05–3.00 (m, 2H, *H*-1, *H*-8), 2.50–2.37 (m, 2H, *H*-3a, *H*-6a), 2.18–1.96 (m, 6H, *H*-2, *H*-3b, *H*-6, *H*-7b) ppm; ^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3): $\delta = 128.8$ (C-4, C-5), 56.7 (C-1, C-8), 28.1 (C-2, C-7), 23.7 (C-3, C-6) ppm.

cis-5-Cycloocten-trans-1,2-diol ((±)-212)

Synthese nach Li *et al.* ^[216]

1,5-Cyclooctadien (**105**, 4.33 g, 40.0 mmol, 1.00 eq), wurde in DCM (130 mL) gegeben. Die Lösung wurde auf 10 °C gekühlt (Eisbad) und unter Rühren portionsweise *m*CPBA (77% in Wasser, 6.90 g, 30.8 mmol, 0.77 eq) zugegeben und anschließend bei 25 °C über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde einmal mit ges. NaHCO₃-Lsg. (50 mL) und zweimal mit NaOH-Lsg. (2 M, je 50 mL) gewaschen und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in H₂O (110 mL) aufgenommen. Zur Lösung wurde LiOH·H₂O (4.36 g, 104.0 mmol, 2.60 eq) gegeben und über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert und die wässrige Phase viermal mit EE (je 100 mL) extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH/EE 2:1) aufgereinigt, wobei (±)-**212** als farbloses Öl erhalten wurde (1.93 g, 13.6 mmol, 34% über 2 Stufen).

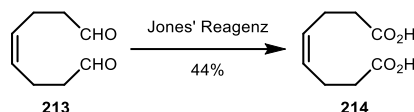
- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.11 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** δ = 5.62–5.51 (m, 2H, *H*-4, *H*-5), 3.73–3.65 (m, 2H, *H*-1, *H*-8), 3.40 (bs, OH), 2.39–2.26 (m, 2H, *H*-3, *H*-6), 2.17–2.02 (m, 4H, *H*-2a, *H*-3, *H*-6, *H*-7a), 1.62–1.50 (m, 2H, *H*-2b, *H*-7b) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** δ = 129.2 (*C*-4, *C*-5), 74.0 (*C*-1, *C*-8), 33.5 (*C*-2, *C*-7), 22.8 (*C*-3, *C*-6) ppm.

cis-4-Octen-1,8-dial (213)

Synthese nach SINGH *et al.* ^[217]

cis-5-Cycloocten-*trans*-1,2-diol (, 900 mg, 6.33 mmol, 1.00 eq) wurde in Et₂O (35 mL) aufgenommen, mit Natriumperiodat (2.40 g, 11.22 mmol, 1.77 eq) und wenigen Tropfen H₂O versetzt und für 4 h bei 25 °C gerührt. Anschließend wurde die organische Phase abdekantiert, der Rückstand in H₂O (30 mL) aufgenommen und viermal mit Et₂O (je 50 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wobei **213** als gelbliche Flüssigkeit erhalten wurde (820 mg, 5.82 mmol, 92%).

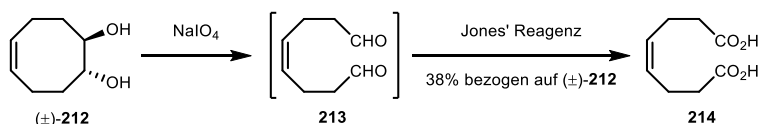
- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.51 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd, DNPH).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** δ = 9.73 (t, *J* = 1.4 Hz, 3H, CHO), 5.39–5.29 (m, 2H, *H*-4, *H*-5), 2.50–2.45 (m, 4H), 2.39–2.31 (m, 4H) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** δ = 201.8 (CHO), 129.0 (*C*-4, *C*-5), 43.6 (*C*-2, *C*-7), 20.1 (*C*-3, *C*-6) ppm.

cis-4-Octendicarbonsäure (214)

Synthese nach SINGH *et al.*^[217]

cis-4-Octen-1,8-dial (**213**, 11.06 g, 78.9 mmol, 1.00 eq) wurde in Aceton (350 mL) aufgenommen. Unter Eiskühlung wurde Jones' Reagenz (1.16 M, 92 mL; Stammlösung aus 10.0 g CrO₃ in 75 mL H₂O und 12 mL konz. H₂SO₄) über 60 min zugetropft und die Reaktionslösung anschließend bei 25 °C über Nacht gerührt. Die Lösung wurde im Vakuum auf ca. 50–80 mL eingengt und dreimal mit DCM (je 150 mL) extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene gelbliche kristalline Feststoff wurde aus ⁿPentan/Et₂O (1:1) umkristallisiert, wobei **214** als farbloser kristalliner Feststoff erhalten wurde (6.04 g, 35.1 mmol, 44%).

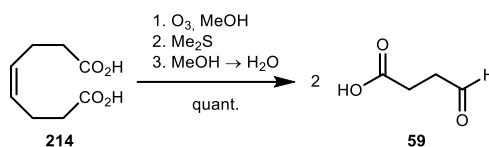
- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.20 (SiO₂, CH/EE 2:1, Anisaldehyd).
- **Schmelzbereich:** Smp. = 102–104 °C.
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃/Methanol-d₄ 10:1):** δ = 5.65 (bs, COOH), 5.40–5.30 (m, 2H, *H*-4, *H*-5), 2.36–2.26 (m, 8H, H₂, *H*-3, *H*-6, *H*-7) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃/Methanol-d₄ 10:1):** δ = 176.8 (COOH), 129.0 (*C*-4, *C*-5), 34.0 (*C*-2, *C*-7), 22.6 (*C*-3, *C*-6) ppm.

cis-4-Octendicarbonsäure (214)

Synthese nach SINGH *et al.*^[217]

cis-5-Cycloocten-*trans*-1,2-diol ((±)-**212**, 8.05 g, 56.6 mmol, 1.00 eq) wurde in Et₂O (300 mL) und H₂O (0.1 Vol.-%) aufgenommen, mit Natriumperiodat (18.76 g, 87.7 mmol, 1.55 eq) versetzt und für 1 d bei 25 °C gerührt. Anschließend wurde die Et₂O-Phase abdekantiert, der Rückstand in H₂O (150 mL) aufgenommen und dreimal mit Et₂O (je 100 mL) extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der rohe Dialdehyd (**213**, ca. 8 g) wurde in Aceton (250 mL) aufgenommen und unter Eiskühlung wurde Jones' Reagenz (1.16 M, 48.8 mL; Stammlösung aus 10.0 g CrO₃ in 75 mL H₂O und 12 mL konz. H₂SO₄) zugetropft und die Reaktionslösung anschließend bei 25 °C über Nacht gerührt. Die Lösung wurde im Vakuum auf ca. 50 mL eingengt und viermal mit EE (je 100 mL) extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der gelbe ölige, semikristalline Rückstand wurde aus ⁿPentan/EE (1:1) umkristallisiert, wobei **214** als farbloser kristalliner Feststoff erhalten wurde (3.73 g, 21.7 mmol, 38% über 2 Stufen).

Die analytischen Daten stimmen mit den bereits vorher gemessenen Daten überein.

4-Oxobutansäure (**59**)

Synthese nach **AAV2a**

Ansatz:

- *cis*-4-Octendicarbonsäure (**214**, 861 mg, 5.00 mmol, 1.00 eq)
- MeOH (abs., 30 mL)
- O₃ (Gasströmungsgeschwindigkeit: $\frac{50 \text{ L O}_2}{h} \cong \frac{3.0 \text{ g O}_3}{h}$)
- Abbruch der Reaktion: Me₂S (460 µL, 6.25 mmol, 1.25 eq)

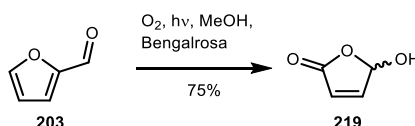
Aufreinigung:

- Die Konzentration der Lösung wurde auf $c \approx 1 \text{ M}$ eingestellt.

Analytik:

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.05$ (SiO₂, CHCl₃/MeOH 50:1, Anisaldehyd), $R_f = 0.33$ (SiO₂, DCM/MeOH 10:1, Anisaldehyd).
- **HPLC:** $t_R = 14.3 \text{ min.}$

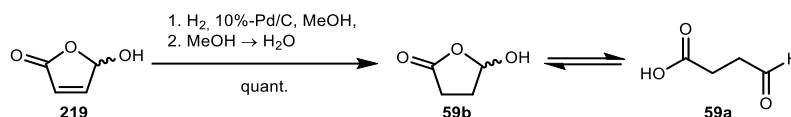
5.4.8.3 Versuche zu Kapitel 4.1.3

5-Hydroxyfuran-2(5H)-on (**219**)

Synthese nach MORITA *et al.* ^[218]

Furfural (**203**, 19.08 g, 198.0 mmol, 1.00 eq, vorher durch Destillation gereinigt) und Bengalrosa (95%, 0.4 g, 0.4 mmol, 0.2 mol-%) wurden in MeOH (abs., 100 mL) gelöst. Die Lösung wurde für 42 h bei einer internen Kühlung auf 25 °C mit O₂ durchspült ($100 \frac{\text{L O}_2}{h}$) und mit einer UV-Lampe bestrahlt (Hochdruck Quecksilberlampe). Nach jeweils 20 h und 24 h nach Reaktionsstart wurde Bengalrosa (je 0.10 g) zugegeben. Im Anschluss wurde die Lösung über Aktivkohle filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wobei **219** als gelblicher Feststoff erhalten wurde (14.91 g, 149.0 mmol, 75%, 98% Reinheit).

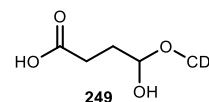
- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.10$ (SiO₂, CHCl₃/MeOH 50:1, Anisaldehyd).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, Methanol-d₄):** $\delta = 7.46$ (dd, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 1H, *H*-4), 6.33–6.25 (m, 2H, *H*-2, *H*-3), 4.77 (s, 1H, OH) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, Methanol-d₄):** $\delta = 173.3$ (C-1), 154.6 (C-3), 124.6 (C-2), 100.7 (C-4) ppm.

5-Hydroxydihydrofuran-2(3H)-on (**59b**) und 4-Oxobutansäure (**59a**)

Anlehnung an NAGAO *et al.*^[219]

Eine Lösung von 5-Hydroxy-2(5H)-furanon (**219**, 510 mg, 5.0 mmol) in MeOH (20 mL) mit 10%-Pd/C (50 mg) wurde unter H₂-Atmosphäre für 3 h gerührt. Die Suspension wurde über Celite® filtriert und mit etwa der gleichen Menge an H₂O versetzt und die Lösung im Vakuum auf ca. 10 mL eingedunstet, sodass eine Konzentration von $c \approx 500 \text{ mM}$ erhalten wurde.

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.05$ (SiO₂, CHCl₃/MeOH 50:1, Anisaldehyd), $R_f = 0.33$ (SiO₂, DCM/MeOH 10:1, Anisaldehyd).
- **HPLC:** $t_R = 14.3 \text{ min.}$
- **¹H-NMR (300.1 MHz, Methanol-d₄):**⁴³ $\delta = 4.53$ (t, $J = 5.6 \text{ Hz}$, 1H, H-4), 2.38 (t, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 2H, H-2), 1.80 (dd, $J = 7.6, 5.6 \text{ Hz}$, 2H, H-3) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, Methanol-d₄):** $\delta = 177.1$ (C-1), 98.7 (C-4), 32.9 (C-3), 30.1 (C-2) ppm.



Die Konzentration c von BSA (**59**) wurde durch die Gleichung $c = \frac{\text{Integralfläche}}{102863} \frac{\text{mmol}}{\text{L}}$ bestimmt, wobei die Integralfläche aus den HPLC-Daten des Signals derivatisierten Substrats bei $t_R = 14.3 \text{ min}$ erhalten wurde. Die Gleichung wurde durch Erstellung einer Eichgerade eines gekauften BSA-Standards⁴⁴ erstellt und ist Abbildung 38 zu entnehmen.

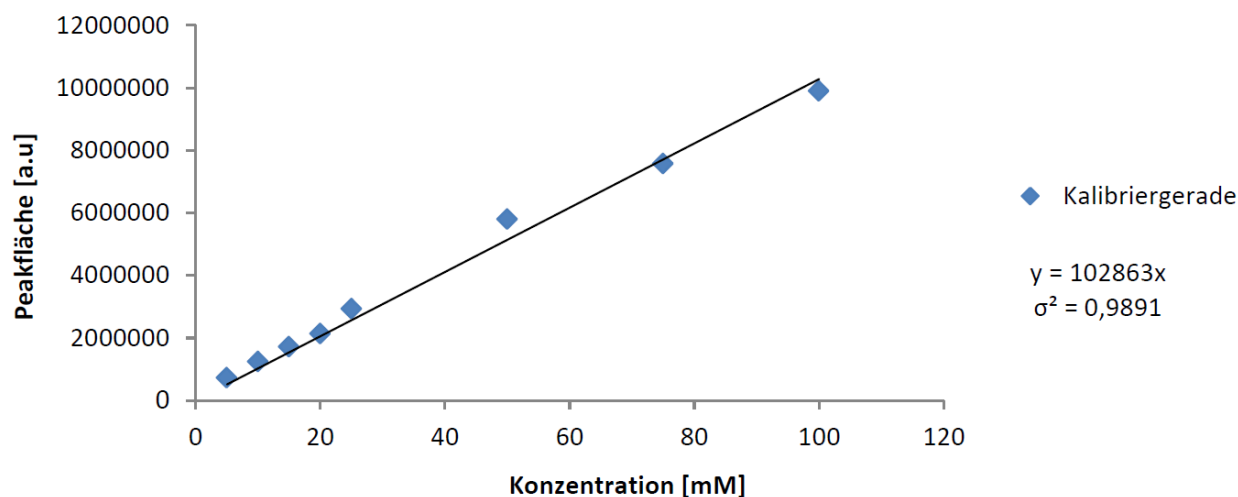


Abbildung 38. Kalibriergerade zur Konzentrationsbestimmung von BSA (**59**).

⁴³ Das Substrat liegt in Methanol-d₄ als Halbacetal **249** vor. [220] Y. Adriaenssens, D. Jimenez Fernandez, L. Vande Walle, F. Elvas, J. Joossens, A. Lambeir, K. Augustyns, M. Lamkanfi, P. Van der Veken, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 7456-7473.

⁴⁴ Das gekaufte Substrat war nicht zu 100% sauber, sodass hier ein Fehler unbekannter Größe in die Rechnung mit einfließt.

5.4.9 Versuche zu Kapitel 4.2

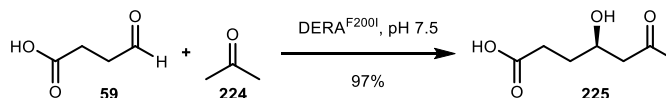
DERA- und FSA-katalysierte Testreaktionen von BSA (59) mit Aceton-Derivaten

Die Testreaktionen wurden nach **AAV6** durchgeführt. Die Ansatzmengen und analytischen Ergebnisse sind in Tabelle 38 zusammengefasst.

Tabelle 38. Screening von DERA- und FSA-Varianten auf Aktivität von BSA (59) mit Aceton-Derivaten.

R	R'	C _{Akzeptor} ^a [mM]	C _{Donor} ^a [mM]	Katalysator	DC ^b	R _f	HPLC ^c	t _R ^d [min]
H	H	50	150 ^e	DERA ^{F200I}	+	0.13 (EE/MeOH 10:1)	+	11.9 + 13.0
H	H	50	150 ^e	PRO-ALD(062)	+	0.13 (EE/MeOH 10:1)	+	11.9 + 13.0
H	H	50	150 ^e	FSA ^{D6H}	–	–	–	–
OH	H	50	150	FSA ^{wt}	–	–	–	–
OH	OH	50	150	FSA ^{A129S}	–	–	–	–
F	H	50	150	DERA ^{F200I}	+	0.21 (DCM/MeOH/AcOH 20:1:1%)	+	14.2 ^f (13.8 + 15.1) ^g
F	H	50	150	PRO-ALD(062)	+	0.21 (DCM/MeOH/AcOH 20:1:1%)	+	14.2 ^f (13.8 + 15.1) ^g
F	F	50	150	DERA ^{F200I}	–	–	–	–
F	F	50	150	PRO-ALD(062)	–	–	–	–

^aEndkonzentration; ^bAnfärbung mit Anisaldehydreagenz; ^cKontrolle nach 0.5, 1, 2, 4, 6, 24 h; ^dbei Angabe von zwei Zeiten: Isomere des derivatisierten Substrats; ^ezusätzlich mit 500 mM Donor getestet; ^fHauptprodukt; ^gNebenprodukt.

(R)-4-Hydroxy-6-oxoheptansäure (225)

Anlehnung an WONG *et al.*^[63]

Eine Mischung aus BSA-Lsg. (**59**, 1 M, 3 mL, 3.00 mmol, 1.00 eq), Aceton-Lsg. (**224**, 2 M, 4.5 mL, 9.00 mmol, 3.00 eq), H₂O (22.5 mL) und DERA^{F200I} (45 mg) wurde auf pH 7.5 eingestellt und für 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MeOH (10 mL) beendet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in MeOH aufgenommen, über Celite® filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wobei **225** als schwach gelbliches Öl erhalten wurde (464 mg, 2.90 mmol, 97%).

- **Dünnschichtchromatographie:** R_f = 0.13 (SiO₂, EE/MeOH 10:1, Anisaldehyd).

- **^1H -NMR (300.1 MHz, Methanol- d_4):** δ = 4.06–3.97 (m, 1H, H -4), 2.58–2.53 (m, 2H, H -5), 2.25 (dt, J = 7.3, 2.1 Hz, 2H, H -2), 2.14 (s, 3H, H -7), 1.77–1.63 (m, H -3) ppm.
- **^{13}C -NMR (75.5 MHz, Methanol- d_4):** δ = 211.1 (C-6), 182.5 (C-1), 69.1 (C-4), 51.9 (C-5), 35.5 (C-2), 34.8 (C-3), 30.6 (C-7) ppm.

D-Fructose-6-phosphat-Spaltungsassay mit FSA^{A129S}

Die unten aufgeführten Reagenzien wurden in folgender Reihenfolge in eine 96-well Mikrotiterplatte gefüllt: 1. NADH (50 mM, 1.5 μL), 2. GDH/TPI-Mix (je 2.6–6.9 U, 1 μL), 3. F6P (1 M, 2 μL) und 4. BSA (pH 7–8, 440 mM, X μL), Gly-Gly-Puffer (50 mM mit 1 mM DTT, pH 8.5, 190.5–X μL). Im Anschluss wurde FSA^{A129S}-Lsg. (1 mg/1 mL, 5 μL) parallel in alle Wells gegeben und die Messung sofort gestartet. Für die Menge „X“ an BSA wurden folgenden Mengen verwendet (in Klammern ist jeweils die Endkonzentration an BSA angegeben): X = 0 μL (0 mM), 50 μL (65 mM), 100 μL (130 mM) und 150 μL (195 mM). Die Blindmessung erfolgt mit 0 μL FSA^{A129S} und 0 μL BSA. Die Messung der UV/Vis-Spektren erfolgt bei einer Wellenlänge von 340 nm.

Analytik:

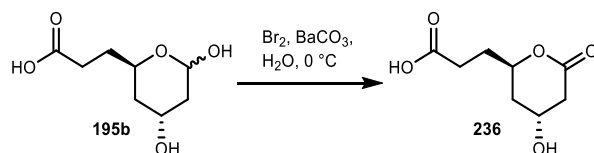
TEA-Salz (237):

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.09$ (SiO_2 , EE/MeOH 6:1, Anisaldehyd).
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, D_2O):** $\delta = 5.26$ (t, $J = 3.5$ Hz, 1H, $H-6_\alpha$), 5.11 (dd, $J = 10.1, 2.2$ Hz, 1H, $H-6_\beta$), 4.38–4.32 (m, 1H, $H-2_\beta$), 4.30–4.20 (m, 2H, β), 4.03–3.98 (m, 6H, $\text{CH}_{2,\text{TEA}}$), 3.98–3.87 (m, 1H, β), 3.56–3.51 (m, 6H, $\text{CH}_{2,\text{TEA}}$), 3.39 (s, 3H, OH_{TEA}), 2.50–2.42 (m, 4H), 2.02–1.92 (m, 2H), 1.90–1.78 (m, 4H), 1.77–1.68 (m, 2H), 1.63–1.47 (m, 4H) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, D_2O):** $\delta = 180.0$ ($\text{CO}_2\text{H}_{\alpha,\beta}$), 92.0 (C-6_β), 91.1 (C-6_α), 70.4 (C-2_β), 65.1 (C-2_α), 64.9 (C-4_β), 63.5 (C-4_α), 55.4 ($\text{CH}_{2,\text{TEA}}$), 55.0 ($\text{CH}_{2,\text{TEA}}$), 38.2 ($\text{CH}_{2,\beta}$), 36.3 ($\text{CH}_{2,\alpha,\beta}$), 36.1 ($\text{CH}_{2,\alpha}$), 31.4 ($\text{CH}_{2,\alpha}$), 31.3 ($\text{CH}_{2,\beta}$), 30.5 ($\text{CH}_{2,\beta}$), 29.7 ($\text{CH}_{2,\alpha}$) ppm.

Reinstoff (159b):

- **Produktverhältnis:** α -Anomer/ β -Anomer 17%:83% in D_2O .
- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.14$ (SiO_2 , EE/MeOH 6:1, Anisaldehyd).
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, D_2O):** $\delta = 5.18$ (t, $J = 3.5$ Hz, 1H, $H-6_\alpha$), 5.04 (dd, $J = 10.2, 2.2$ Hz, 1H, $H-6_\beta$), 4.31–4.25 (m, 1H, $H-2_\beta$), 4.24–4.13 (m, 2H, α), 3.92–3.82 (m, 1H, β), 2.50–2.43 (m, 4H), 1.95–1.82 (m, 2H), 1.82–1.70 (m, 4H), 1.70–1.59 (m, 2H), 1.56–1.40 (m, 4H) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, D_2O):** $\delta = 178.5$ ($\text{CO}_2\text{H}_{\alpha,\beta}$), 92.0 (C-6_β), 91.2 (C-6_α), 70.2 (C-2_β), 64.8 (C-2_α , C-4_β), 63.4 (C-4_α), 38.2 ($\text{CH}_{2,\beta}$), 36.3 ($\text{CH}_{2,\alpha,\beta}$), 36.0 ($\text{CH}_{2,\alpha}$), 30.3 ($\text{CH}_{2,\alpha}$), 30.2 ($\text{CH}_{2,\beta}$), 30.0 ($\text{CH}_{2,\beta}$), 29.2 ($\text{CH}_{2,\alpha}$) ppm.

3-((2R,4R)-4-Hydroxy-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl)propansäure (236)



Anlehnung an GIJSEN *et al.*^[62]

Das Lactol (**195b**, 95 mg, 0.50 mmol, 1.00 eq) wurde in H_2O (7.0 mL) gelöst, mit BaCO_3 (165 mg, 0.84 mmol, 1.67 eq) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde unter Lichtausschluss Br_2 (30 μL , 0.65 mmol, 1.30 eq) zugegeben und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Auf Grund des Vorhandenseins von Salzen konnte keine exakte Ausbeute berechnet werden.⁴⁵ Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung direkt weiter umgesetzt.

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.46$ (SiO_2 , EE/MeOH 6:1, Anisaldehyd).
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, D_2O):** $\delta = 4.89$ –4.81 (m 1H, $H-2$), 4.51–4.46 (m, 1H, $H-4$), 2.96 (dd, $J = 18.1, 4.8$ Hz, 1H, $H-5a$), 2.71 (ddd, $J = 18.1, 3.5, 1.8$ Hz, 1H, $H-5b$), 2.43 (dt, $J = 7.7, 4.0$ Hz, 2H, $H-2'$), 2.14 (dddd, $J = 14.7, 4.2, 3.5, 1.9$ Hz, 1H, $H-3a$), 2.09–1.95 (m, 3H, $H-3b$, $H-3'$) ppm.

⁴⁵ Eine Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (EE/MeOH 6:1) war nicht erfolgreich, da sich das gebildete Produkt entgegen der Beobachtung, dass sich die Reaktion durch DC-Kontrolle verfolgen ließ, in den einzelnen Fraktionen sich nicht mittels eines Färbereagenzes anfärben ließ. Nach NMR-Analyse des Rückstandes konnte gezeigt werden, dass das Edukt **195b** vollständig umgesetzt wurde und zwei neue Verbindungen erhalten wurden, wovon eine dem Lacton **236** zugeordnet werden konnte. Das Lacton enthält in Anteilen den Methylester sowie diverse Barium- und/oder Bromidsalze.

- **^{13}C -NMR (75.5 MHz, D_2O):** $\delta = 182.4$ (C-1'), 175.0 (C-6), 77.6 (C-2), 62.0 (C-4), 37.4 (CH_2), 34.0 (CH_2), 32.9 (CH_2), 31.4 (CH_2) ppm.

Methyl-(*R*)-3-hydroxy-4-((*R*)-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)butanoat (237**)**

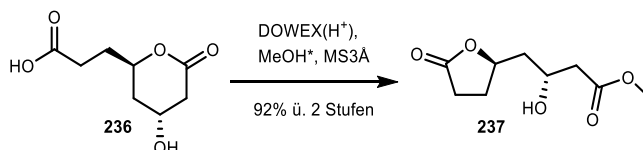


Anlehnung an CHUNG *et al.* [221]

Das Lacton⁴⁶ (**236**, 60 mg, 0.32 mmol, 1.00 eq) wurde in MeOH (2.5 mL) gelöst, mit 2 Tropfen H_2SO_4 (konz.) sowie einer Spatelspitze Molekularsieb (3\AA , Pulver) versetzt und für 3.5 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand fünfmal mit EE (je 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wobei **237** als gelb-oranges Öl erhalten wurde (47 mg, 0.21 mmol, 67%⁴⁷ über 2 Stufen).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.28$ (SiO_2 , EE/MeOH 6:1, Anisaldehyd).
- **^1H -NMR (300.1 MHz, Methanol- d_4):** $\delta = 4.81\text{--}4.71$ (m, 1H, *H*-5), 4.24–4.15 (m, 1H, *H*-3), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 2.68–2.36 (m, 5H, *H*-2, *H*-6a, *H*-7), 2.06–1.78 (m, 3H, *H*-4, *H*-6b) ppm.
- **^{13}C -NMR (75.5 MHz, Methanol- d_4):** $\delta = 180.0$ (C-8), 173.6 (C-1), 80.0 (C-5), 66.0 (C-3), 52.1 (OCH_3), 43.0 (CH_2), 42.8 (CH_2), 29.4 (CH_2), 28.8 (C-3) ppm.

Methyl-(*R*)-3-hydroxy-4-((*R*)-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)butanoat (237**)**



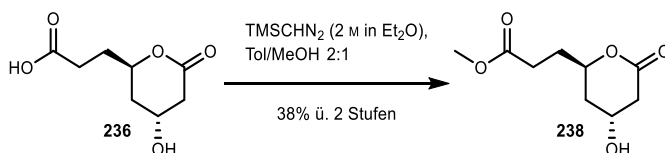
Das Lacton⁴⁸ (**236**, 47 mg, 0.25 mmol, 1.00 eq) wurde in MeOH (abs., 5.0 mL) gelöst, mit einer Spatelspitze DOWEX[®](H^+) sowie einer Spatelspitze Molekularsieb (3\AA , Pulver) versetzt und für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Rückstand wurde abfiltriert, mit wenig EE gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Öl wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Mikrosäule, CH/EE 1:1 \rightarrow 1:4) aufgereinigt, wobei **237** als farbloses Öl erhalten wurde (51 mg, 0.23 mmol, 92% über 2 Stufen).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.28$ (SiO_2 , CH/EE 1:5, Anisaldehyd).

⁴⁶ Siehe Fußnote 45, Seite 210.

⁴⁷ Das Ergebnis ist unter Vorbehalt zu betrachten, da aus Beobachtungen hervorgeht, dass das Lacton **237** in organischen Lösungsmitteln schlecht löslich ist und der Methylester eventuell aus der vorausgegangenen Stufe isoliert wurde und somit keine Umsetzung stattgefunden hat.

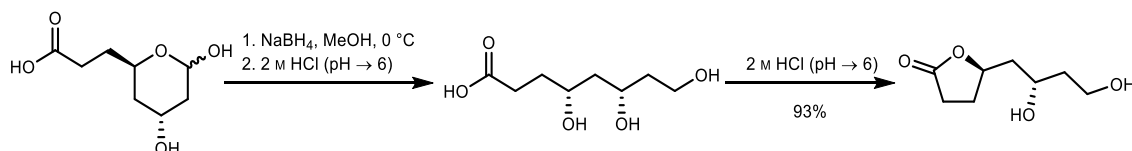
⁴⁸ Siehe Fußnote 45, Seite 210.

Methyl-3-((2R,4R)-4-hydroxy-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl)propanoat (238)

Anlehnung an SCHMIDT *et al.*^[222]

Das Lacton⁴⁹ (**236**, 94 mg, 0.50 mmol, 1.00 eq) wurde mit verdünnter HCl angesäuert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Im Anschluss wurde der Rückstand in Tol/MeOH (2:1, 1.5 mL) suspendiert und dazu TMSCHN₂-Lsg. (2 M in Et₂O, 300 µL, 0.60 mmol, 1.20 eq) zugetropft, wobei sich die Lösung gelb färbte und eine Gasentwicklung zu beobachten war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von AcOH beendet, bis keine Gasentwicklung mehr zu erkennen war und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (EE → EE/MeOH 1:1) aufgereinigt. Es wurde eine Fraktion erhalten, welche **238** in etwa 80%iger Reinheit enthält (38 mg⁵⁰, 0.19 mmol, 38% über 2 Stufen, 80% Reinheit).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.72$ (SiO₂, EE/MeOH 6:1, Anisaldehyd, Seebach).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃):** $\delta = 4.79\text{--}4.65$ (m, 1H, *H*-2), 4.27–4.15 (m, 1H, *H*-4), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 2.59–2.32 (m, 5H, *H*-2', *H*-3a, *H*-5), 2.07–1.63 (m, *H*-3b, *H*-3') ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃):** $\delta = 177.1$ (C-1'), 173.0 (C-6), 78.2 (C-2), 65.1 (C-4), 51.9 (OCH₃), 41.5 (CH₂CO₂R), 41.0 (CH₂CO₂R), 28.7 (CH₂), 28.1 (CH₂) ppm.

(S)-5-((S)-2,4-Dihydroxybutyl)dihydrofuran-2(3H)-on (240)

Anlehnung an BALLINI *et al.*^[223]

Zu einer Lösung des Lactols (**195b**, 190 mg, 1.00 mmol, 1.00 eq) in MeOH (abs., 5 mL) wurde portionsweise Natriumborhydrid (95 mg, 2.50 mmol, 2.50 eq) bei 0 °C zugegeben und 15 min bei dieser Temperatur gerührt. Danach wurde mit HCl-Lsg. (2 M) auf pH 6 eingestellt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt⁵¹ und der Rückstand dreimal mit Et₂O (je 30 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wobei **240** als farbloses Öl erhalten wurde (162 mg, 0.93 mmol, 93%). Zur Verbesserung der Reinheit kann der ölige Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (EE/MeOH 3:1) aufgereinigt werden.

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f = 0.20$ (**239**, SiO₂, EE/MeOH 6:1, Anisaldehyd); $R_f = 0.28$ (**240**, SiO₂, EE/MeOH 6:1, Anisaldehyd).

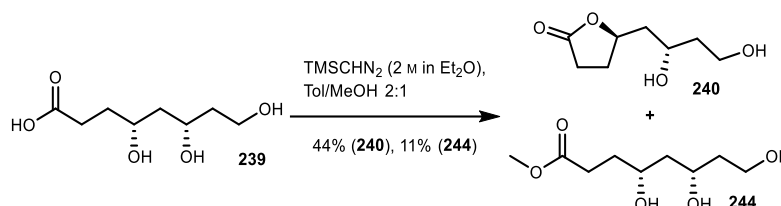
⁴⁹ Siehe Fußnote 45, Seite 210.

⁵⁰ Korrigierter Wert; Das gebildete Produkt ließ sich in den einzelnen Fraktionen nicht mittels eines Färbereagenzes anfärben (entgegen der Beobachtung, dass sich die Reaktion durch DC-Kontrolle verfolgen ließ).

⁵¹ Wird die Lösung auf pH 6 eingestellt, das Lösungsmittel sofort entfernt und dann ein NMR aufgenommen, dann lässt sich die Carbonsäure **239** nachweisen. Die ¹³C-NMR Signale sind aufgrund des Vorhandenseins von (Bor-)Salzen stark verbreitert.

- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, D_2O , **239**):** δ = 4.29–3.83 (m, 2H, H -4, H -6), 3.82–3.74 (m, 2H, H -8), 2.56–2.37 (m, 2H, H -2), 1.98–1.55 (m, 6H, H -3, H -5, H -7) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, D_2O , **239**):** δ = 180.5 (C-1), 69.1 (b, C-4), 67.1 (b, C-6), 58.6 (C-8), 43.2 (b, C-2), 38.4 (b, CH_2), 32.1 (CH_2), 31.5 (b, CH_2) ppm.
- **$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, D_2O , **240**):** δ = 4.94–4.83 (m, 1H, H -5), 3.99 (tt, J = 8.3, 4.5 Hz, 1H, H -2'), 3.77 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H -4'), 2.74–2.65 (m, 2H, H -3), 2.50 (dddd, J = 13.3, 8.8, 6.7, 4.7 Hz, 1H, H -4a), 2.12–1.99 (m, 2H, H -1'), 1.97–1.69 (m, 3H, H -3', H -4b) ppm.
- **$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, D_2O , **240**):** δ = 182.1 (C-2), 80.8 (C-5), 65.8 (C-2'), 58.5 (C-4'), 41.7 (C-1'), 38.5 (C-3'), 28.6 (C-3), 27.5 (C-4) ppm.

(S)-5-((S)-2,4-Dihydroxybutyl)dihydrofuran-2(3H)-on (240**) und (4R,6S)-Methyl-4,6,8-trihydroxyoctanoat (**244**)**

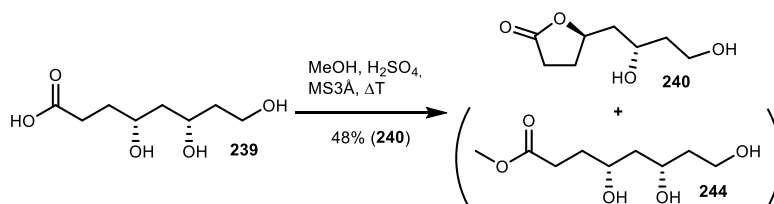


Anlehnung an SCHMIDT *et al.*^[222]

Die Carbonsäure⁵² (**239**, 96 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) wurde in Tol/MeOH (2:1, 1.5 mL) suspendiert und TMSCHN₂-Lsg. (2 M in Et₂O, 320 μL , 0.64 mmol, 1.28 eq) zugetropft, bis eine Gelbfärbung bestehen blieb. Im Anschluss wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt und dann das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (EE) aufgereinigt, wobei **240** und **244** jeweils als farbloses Öl erhalten wurden (38 mg **240**, 0.22 mmol, 44%; 10 mg **244**, 0.05 mmol, 11%).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f(\textbf{240})$ = 0.34 (SiO_2 , EE/MeOH 6:1, Anisaldehyd), $R_f(\textbf{244})$ = 0.55 (SiO_2 , EE/MeOH 6:1, Anisaldehyd).

(S)-5-((S)-2,4-Dihydroxybutyl)dihydrofuran-2(3H)-on (240**) und (4R,6S)-Methyl-4,6,8-trihydroxyoctanoat (**244**)**



Anlehnung an CHUNG *et al.*^[221]

Die Carbonsäure⁵³ (**239**, 96 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq) wurde in MeOH (abs., 2.5 mL) gegeben, mit 2 Tropfen H₂SO₄ (konz.) sowie einer Spatelspitze Molekularsieb (3 \AA , Pulver) versetzt und für 16 h unter Rückfluss erhitzt. Die Mischung wurde filtriert, mit wenig MeOH gewaschen [hier wurde eine NMR-Probe in Methanol-d₄

⁵² Siehe Fußnote 51, Seite 212.

⁵³ Siehe Fußnote 51, Seite 212.

genommen⁵⁴], dann mit wenig DCM gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Zum Rückstand wurde erneut DCM zugegeben, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt [hier wurde eine NMR-Probe in CDCl₃ genommen], wobei **240** als farbloses Öl erhalten wurde (41 mg, 0.24 mmol, 48%).

- **Dünnschichtchromatographie:** $R_f(\mathbf{240}) = 0.36$ (SiO₂, EE/MeOH 6:1, Anisaldehyd), $R_f(\mathbf{244}) = 0.66$ (SiO₂, EE/MeOH 6:1, Anisaldehyd).
- **¹H-NMR (300.1 MHz, Methanol-d₄):**⁵⁵ $\delta = 4.87\text{--}4.75$ (m, 2H, *H*-5_χ, *H*-6_ψ), $4.33\text{--}4.24$ (m, 1H, *H*-4_ψ), $4.04\text{--}3.91$ (m, 1H, *H*-2'_χ), $3.80\text{--}3.72$ (m, 5H, *H*-4'_χ, OCH_{3,ψ}), $3.43\text{--}3.35$ (m 2H, *H*-8_ψ), $2.72\text{--}2.52$ (m, 2H, *H*-3_χ), $2.56\text{--}2.42$ (m, 3H, *H*-4a_χ, *H*-2_ψ), $2.11\text{--}1.91$ (m, 2H, *H*-1'_χ), $1.90\text{--}1.63$ (m, 9H, *H*-3_ψ, *H*-3'_χ, *H*-4b_χ, *H*-5_ψ, *H*-7_ψ) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, Methanol-d₄):** $\delta = 180.1$ (C-2_χ), 176.0 (C-1_ψ), 80.5 (C-5_χ), 70.3 (C-4_ψ), 68.9 (C-6_ψ), 66.7 (C-2'_χ), 60.0 (C-8_ψ), 59.9 (C-4'_χ), 52.1 (OCH_{3,ψ}), 45.1 (C-2_ψ), 43.8 (C-1'_χ), 40.8 (CH_{2,ψ}), 40.7 (C-3'_χ), 33.4 (CH_{2,ψ}), 29.5 (C-3_χ), 31.0 (CH_{2,ψ}), 29.0 (C-4_χ) ppm.
- **¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃, **240**):** $\delta = 4.90\text{--}4.51$ (m, 1H, *H*-5_χ), $4.25\text{--}3.97$ (m, 1H, *H*-2'_χ), $3.96\text{--}3.19$ (m, 4H, *H*-4'_χ, 2x OH_χ), $2.66\text{--}2.27$ (m, 3H, *H*-3_χ, *H*-4a_χ), $2.11\text{--}1.47$ (m, 5H, *H*-1'_χ, *H*-3'_χ, *H*-4b_χ) ppm.
- **¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, **240**):** $\delta = 177.6$ (C-2_χ), 79.2 (C-5_χ), 68.6 (C-2'_χ), 60.9 (C-4'_χ), 42.9 (C-1'_χ), 38.5 (C-3'_χ), 28.8 (C-3_χ), 28.4 (C-4_χ) ppm.

5.5 DERA-Sequenzen

PRO-ALD(024):

MNLAKYIDHTILAPEATQSQVDQIIKEAKKYDFASVVNPNYVWSYVADKLKGTDVNTVTVIGFPLGANTTATKVFEAKDALQN
GATELDMVINIGELKAGHDDAVLNDIKAVVEAGHAENRHVKVVIETALLTDEEKVRACELSEKAGADFKTSTGFSTAGAKVAD
VKLMKQTVGDRLGVKASGGIHTKSEAEAMIEAGATRLGASSGVKIMNS

PRO-ALD(062):

MELTTAELARYLDHTNLKPDATQAEIEQTCQEAKKYQTASVCVNAHWIPLVKAQLADSPVNPIAVVGFLGATSTAARKVAEA
QDAMNAGAEEDMVINIGELLSSNNDTFVQSDIAAVSAAVHQENKLLKVIIETSFLNNDQIVKACQLAEAAQADYVKTSTGFSS
AGAKVEDVALMRKTVGDRLGVKASGGIHSRQEALDMIAAGASRLGVSATVKILEEN

DERA^{EC}:

HMTDLKASSLRALKLMDLTTLNDDDTDEKVIALCHQAKTPVGNTAAICIYPRFIPIARKTLKEQGTPEIRIATVTNFPHGNDIDID
ALAETRAAIYGADEVDDVFPYRALMAGNEQVGFDLVKACKEACAAANVLLKVIIETGELKDEALIRKASEISIKAGADFIKTSTG
KVAVNATPESARIMMEVIRDMGVEKTVGFKPAGGVRTAEDAQKYLAIADELFGADWADARHYRFGASSLLASLLKALGHGD
GKSASSY

⁵⁴ Der Rückstand des Rohproduktes war größtenteils unlöslich in D₂O, Methanol-d₄ und CDCl₃. Es wurden zwei NMR-Proben (jeweils in Methanol-d₄ und CDCl₃) vorbereitet. In Methanol-d₄ wurde eine Mischung aus **240** und **244** beobachtet. Das Produktverhältnis wurde aus dem ¹³C-NMR des Rohproduktes durch Vergleich der Relation der Integralfächen der CH₂-Gruppen (Produktverhältnis: Lacton **240**/Methylester **244** 81:19) bestimmt. In CDCl₃ wurde ausschließlich das Lacton **240** beobachtet. Eine Ausbeute des Methylesters **244** konnte aufgrund der unabtrennbaren Unreinheiten nicht bestimmt werden.

⁵⁵ Die Signale des Lactons **240** sind mit Index χ und des Methylesters **244** mit ψ versehen.

Blast-Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Programm *BLAST*.

```

ALD-DERA_024_  -----M----NLAKYIDHTILAPEATQSQVDQIIKEAKK--YDFASVVVNPYWVSIVADKLKG---
ALD-DERA_062_  -----MELTTAELARYLDHTNLKPDATQAEIEQTCQEAKK--YQTASVCVNAHWIPLVKAQLAD---
DERA Ec        HMTDLKASSLRALKLMDLTTLNDDDTDEKVIALCHQAKTPVGNTAAICIIYPRFIPIARKTLKEQGT
cons           .  :  :*  *  *  :  *:  ::      ::*  .  :  *::  :  .  :.  .  *

ALD-DERA_024_  TDVNTVTVIGFPLGANTTATKVFEAKDALQNGATELDMVINIGELKAGHDDAVLNDIKAVVEAGHA
ALD-DERA_062_  SPVNPIAVVGFPFGATSTAARKVAEQDAMNAGAEIEMVINIGELLSNNDTFVQSDIAAVSAAVHQ
DERA Ec        PEIRIATVTNFPFGNDDIDIALAETRAAIAYGADEVVVFPYRALMAGNEQVGFDLVKACKEACAA
cons           .  :.  :  *  .**  *      :  *:  *:  **  *:*:*  :  *  :.:  .  :  *  *

ALD-DERA_024_  ENRHVKVIIETALL-TDEEKVRACELSEKAGADFVKTSTGTFSTAGAKVADVCLMKQTVG-----DR
ALD-DERA_062_  ENKLLKVIIETSFL-NNDQIVKACQLAEAAQADYVKTSTGFSSAGAKVEDVALMRKTVG-----DR
DERA Ec        ANVLLKVIIETGELKDEALIRKASEISIKAGADFIKTSTGKVAVNATPESARIMMEVIRDMGVEKT
cons           *  :*****.  *  :      :*:::  *  **::*****  :..*.  ..  :*  :.:  .

ALD-DERA_024_  LGVKASGGIHTKSEAEAMIEAG-----ATRLGASSGV-KIMNS-----
ALD-DERA_062_  LGVKASGGIHSRQEALDMIAAG-----ASRLGVSATV-KILEEN-----
DERA Ec        VGFKPAGGVRTAEDAQKYLAIADELFGADWADARHYRFGASSLLASLLKALGHGDGKSASSY
cons           :*.*.:*:::  .:*  :  .      *:*.*:  :  :.:

```

PRO-ALD(024) – DERA^{Ec}: 33% Identität, 50% Ähnlichkeit.

PRO-ALD(062) – DERA^{Ec}: 30% Identität, 50% Ähnlichkeit.

PRO-ALD(024) – PRO-ALD(062): 59% Identität, 77% Ähnlichkeit.

6 Abkürzungsverzeichnis

AA	Acetaldehyd	FA	Formaldehyd
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift	FBP	D-Fructose-1,6-bisphosphat
abs.	absolutiert	F6P	D-Fructose-6-phosphat
AD	Asymmetrische Dihydroxylierung	FruA	D-Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase
AI	(engl.) <i>auto induction</i>	FSA	D-Fructose-6-phosphat-Aldolase
aq	(engl.) <i>aqueous</i>	GC	Gaschromatographie
ax	axial	GDH	Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase
Bn	Benzyl	Gew.-%	Gewichtsprozent
bs	Breites Singulett (NMR)	GO	Glykolaldehyd
BSA	Bernsteinsäuresemialdehyd	gef.	gefunden
c	Konzentration (in M)	ges.	gesättigte(r)
CalB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B	HA	Hydroxyaceton
Cbz	Benzyloxycarbonyl	HB	1-Hydroxybutan-2-on
CH	Cyclohexan	HMBC	(engl.) <i>Heteronuclear multiple bond correlation</i> (hier [$^1\text{H}/^{13}\text{C}$]-HMBC)
CoA	Coenzym A	HMG	3-Hydroxy-3-methylglutaryl
COSY	(engl.) <i>Correlation spectroscopy</i>	HPLC	(engl.) <i>High performance liquid chromatography</i>
d	Dublett (NMR) oder Tag(e)	HR	(engl.) <i>High resolution</i>
DC	Dünnschichtchromatographie	HSQC	(engl.) <i>Heteronuclear single quantum Coherence</i> (hier [$^1\text{H}/^{13}\text{C}$]-HSQC)
DCM	Dichlormethan	h	Stunde(n)
DERA	D-Desoxyribose-5-phosphat-Aldolase	<i>J</i>	Kopplungskonstante (in Hz)
de	(engl.) <i>diastereomeric excess</i>	konz.	konzentriert/e
DHA	1,3-Dihydroxyaceton	Lit.	Literatur
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat	Lsg.	Lösung
dia	Diastereomerengemisch	mCPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
DIBAL	Diisobutylaluminiumhydrid	M	Molarität (in mol/L)
(+)-DIPT	(+)-Diisopropyltartrat	m	Multipllett (NMR)
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin	M_R	Durchschnittliche Proteinmasse (in Da)
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	min	Minute(n)
DMSO	Dimethylsulfoxid	MS	Massenspektrometrie
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin	MS3Å	Molekularsieb 3Å
DOWEX	Ionenustauscherharz	MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
dr	(engl.) <i>diastereomeric ratio</i>	NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
DTT	Dithiothreitol	NeuA	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure-Aldolase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	NMR	(engl.) <i>Nuclear magnetic resonance</i>
EE	Essigsäureethylester	NOESY	(engl.) <i>Nuclear overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i> (hier [$^1\text{H}/^1\text{H}$]-NOESY)
ee	(engl.) <i>enantiomeric excess</i>		
eq	Äquivalente oder äquatorial		
er	(engl.) <i>enantiomeric ratio</i>		
ESI	(engl.) <i>Electron spray ionization</i>		
et al.	(lat.) <i>et alii</i> oder <i>et aliae</i>		

OK	Offene Kette	Sdp.	Siedepunkt/bereich (in °C)
P3/4	Porengröße 3 bzw. 4 µm bei Glasfritten	Smp.	Schmelzpunkt/bereich (in °C)
PCC	Pyridiniumchlorochromat	t _R	Retentionszeit
PDB ID	(engl.) <i>Protein data bank identification</i>	t	Triplett (NMR)
PDC	Pyridiniumdichromat	TEA	Triethanolamin
PEP	Phosphoenolpyruvat	THF	Tetrahydrofuran
Piv	Pivaloyl	TIM	Triosephosphatisomerase
PLP	Pyridoxalphosphat	TMS	Trimethylsilyl
ppm	(engl.) <i>parts per million</i>	Tol	Toluen
pTsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure	TPI	Triosephosphat Isomerase
q	Quartett (NMR)	UV/Vis	Ultraviolettes und sichtbares Licht
Q-TOF	(engl.) <i>quadrupole time-of-flight</i>	UV	Ultraviolett
quant.	Quantitative	Vol.-%	Volumenprozent
R	Ringform	wt	Wildtyp
R _f	Retentionsfaktor	δ	Chemische Verschiebung (in ppm)
<i>rac</i>	racemisch	ΔT	Erhitzen (i.d.R. Unter Rückfluss)
rpm	(engl.) <i>revolutions per minute</i>)))	Ultraschall
s	Singulett (NMR)		

Aminosäuren sind gemäß dem Ein- oder Dreibuchstabencode abgekürzt.^[224] Bei Protein-Varianten sind die geänderten Aminosäuren im Exponenten angegeben, wobei die vor der Zahl genannte Aminosäure die ausgetauschte Aminosäure ist, die Zahl die Position im Protein angibt und die der Zahl nachgestellte Aminosäure die neue Aminosäure bezeichnet (z. B. FSA^{A129S}: Alanin in Position 129 gegen Serin ausgetauscht).

7 Quellenverzeichnis

- [1] B. M. Trost, I. Fleming, *Comprehensive organic synthesis selectivity, strategy & efficiency in modern organic chemistry*, Pergamon Press, Oxford etc., **1991**.
- [2] P. Knochel, J. Johnson, K. Mikami, I. Marek, S. Ma, A. Fürstner, S. Burke, P. Knochel, J. Clayden, C. J. Welch, *Comprehensive organic synthesis*, Second edition ed., Elsevier, Amsterdam, **2014**.
- [3] Y. Yamashita, T. Yasukawa, W.-J. Yoo, T. Kitano, S. Kobayashi, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 4388-4480.
- [4] A. T. Nielsen, W. J. Houlihan, *Organic Reactions*, John Wiley & Sons, Inc., **2004**.
- [5] T. Mukaiyama, *Organic Reactions*, John Wiley & Sons, Inc., **2004**.
- [6] L. M. Geary, P. G. Hultin, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 131-173.
- [7] Z. G. Hajos, D. R. Parrish, *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1615-1621.
- [8] U. Eder, G. Sauer, R. Wiechert, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1971**, *10*, 496-497.
- [9] B. List, R. A. Lerner, C. F. Barbas, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2395-2396.
- [10] M. Mutter, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 639-653.
- [11] A. Tramontano, K. D. Janda, R. A. Lerner, *Science* **1986**, *234*, 1566-1570.
- [12] S. J. Pollack, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *Science* **1986**, *234*, 1570-1573.
- [13] J. Wagner, R. A. Lerner, C. F. Barbas, *Science* **1995**, *270*, 1797-1800.
- [14] K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry* Seventh extended and corrected edition ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2011**.
- [15] T. Kitazume, J. T. Lin, M. Takeda, T. Yamazaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2123-2126.
- [16] S. C. Sinha, E. Keinan, J. L. Reymond, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4893-4894.
- [17] S. C. Sinha, E. Keinan, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3653-3654.
- [18] S. C. Sinha, J. Sun, G. P. Miller, M. Wartmann, R. A. Lerner, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1691-1702.
- [19] K. Janda, C. Shevlin, R. Lerner, *Science* **1993**, *259*, 490-493.
- [20] W.-D. Fessner, A. Schneider, H. Held, G. Sinerius, C. Walter, M. Hixon, J. V. Schloss, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2219-2221.
- [21] B. M. Trost, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 259-281.
- [22] P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301-312.
- [23] T. Gefflaut, C. Blonski, J. Perie, M. Willson, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1995**, *63*, 301-340.
- [24] S. Thorell, M. Schürmann, G. A. Sprenger, G. Schneider, *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 161-171.
- [25] A. K. Samland, M. Rale, G. A. Sprenger, W.-D. Fessner, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1454-1474.
- [26] A. K. Samland, G. A. Sprenger, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *71*, 253-264.
- [27] M. Schürmann, G. A. Sprenger, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11055-11061.
- [28] M. L. di Salvo, S. G. Remesh, M. Vivoli, M. S. Ghatge, A. Paiardini, S. D'Aguanno, M. K. Safo, R. Contestabile, *FEBS J.* **2014**, *281*, 129-145.
- [29] K. Hernández, A. Szekrenyi, P. Clapés, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1353-1358.
- [30] M. L. Di Salvo, N. Budisa, R. Contestabile, in *Beilstein Bozen Symposium on Molecular Engineering and Control, Zugriff 26.02.19*, Beilstein-Institut, Prien (Chiemsee), Germany, **2013**.
- [31] R. N. Goldberg, Y. B. Tewari, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1995**, *24*, 1669-1698.
- [32] K. Faber, W.-D. Fessner, N. J. Turner, *Biocatalysis in organic synthesis*, Thieme, Stuttgart, **2015**.
- [33] K. Fesko, L. Giger, D. Hilvert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5987-5990.
- [34] K. Fesko, C. Reisinger, J. Steinreiber, H. Weber, M. Schürmann, H. Griengl, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *52-53*, 19-26.
- [35] J. Q. Liu, T. Dai, N. Itoh, M. Kataoka, S. Shimizu, H. Yamada, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *10*, 107-115.

- [36] J. Q. Liu, M. Odani, T. Yasuoka, T. Dairi, N. Itoh, M. Kataoka, S. Shimizu, H. Yamada, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *54*, 44-51.
- [37] N. Duckers, K. Baer, S. Simon, H. Groger, W. Hummel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *88*, 409-424.
- [38] D. G. Comb, S. Roseman, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 2529-2537.
- [39] P. Clapés, J. Joglar, in *Modern Methods in Stereoselective Aldol Reactions*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2013**, pp. 475-527.
- [40] W. D. Fessner, C. Walter, *Bioorg. Chem.* **1997**, *184*, 97-194.
- [41] M. Schümperli, R. Pellaux, S. Panke, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *75*, 33-45.
- [42] A. Li, L. Cai, Z. Chen, M. Wang, N. Wang, H. Nakanishi, X.-D. Gao, Z. Li, *Carbohydr. Res.* **2017**, *452*, 108-115.
- [43] J. A. Castillo, J. Calveras, J. Casas, M. Mitjans, M. P. Vinardell, T. Parella, T. Inoue, G. A. Sprenger, J. Joglar, P. Clapés, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 6067-6070.
- [44] X. Garrabou, J. A. Castillo, C. Guérard-Hélaine, T. Parella, J. Joglar, M. Lemaire, P. Clapés, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 5521-5525.
- [45] A. L. Concia, C. Lozano, J. A. Castillo, T. Parella, J. Joglar, P. Clapés, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3808-3816.
- [46] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC, **2002**.
- [47] J. A. Castillo, C. Guérard-Hélaine, M. Gutiérrez, X. Garrabou, M. Sancelme, M. Schürmann, T. Inoue, V. Hélaine, F. Charmantray, T. Gefflaut, L. Hecquet, J. Joglar, P. Clapés, G. A. Sprenger, M. Lemaire, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1039-1046.
- [48] M. Sugiyama, Z. Hong, P.-H. Liang, S. M. Dean, L. J. Whalen, W. A. Greenberg, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14811-14817.
- [49] S. Schneider, T. Sandalova, G. Schneider, G. A. Sprenger, A. K. Samland, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 30064-30072.
- [50] J. Jia, U. Schorken, Y. Lindqvist, G. A. Sprenger, G. Schneider, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 119-124.
- [51] D. Enders, K.-E. Jäger, *Asymmetric Synthesis with Chemical and Biological Methods*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [52] E. Racker, *J. Biol. Chem.* **1952**, *196*, 347-365.
- [53] A. Heine, G. DeSantis, J. G. Luz, M. Mitchell, C.-H. Wong, I. A. Wilson, *Science* **2001**, *294*, 369-374.
- [54] A. Heine, J. G. Luz, C.-H. Wong, I. A. Wilson, *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, 1019-1034.
- [55] M. T. D., W. Chi - Huey, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 1352-1375.
- [56] C. F. Barbas, Y. F. Wang, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2013-2014.
- [57] L. Chen, D. P. Dumas, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 741-748.
- [58] H. Fei, C. C. Zheng, X. Y. Liu, Q. Li, *Process Biochem. (Amsterdam, Neth.)* **2017**, *63*, 55-59.
- [59] M. Dick, R. Hartmann, O. H. Weiergraber, C. Bisterfeld, T. Classen, M. Schwarten, P. Neudecker, D. Willbold, J. Pietruszka, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 4492-4502.
- [60] H. J. M. Gijsen, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2947-2948.
- [61] H. J. M. Gijsen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7585-7591.
- [62] H. J. M. Gijsen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8422-8423.
- [63] C.-H. Wong, E. Garcia-Junceda, L. Chen, O. Blanco, H. J. M. Gijsen, D. H. Steensma, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3333-3339.
- [64] M. Müller, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 362-365.
- [65] M. Müller, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 3161-3174.
- [66] M. Wolberg, B. H. N. Dassen, M. Schürmann, S. Jennewein, M. G. Wubbolts, H. E. Schoemaker, D. Mink, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1751-1759.
- [67] R. N. Patel, *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 1252-1274.
- [68] M. Haridas, E. M. M. Abdelraheem, U. Hanefeld, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 9959-9971.
-

-
- [69] W. A. Greenberg, A. Varvak, S. R. Hanson, K. Wong, H. Huang, P. Chen, M. J. Burk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 5788-5793.
- [70] G. DeSantis, J. Liu, D. P. Clark, A. Heine, I. A. Wilson, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 43-52.
- [71] A. Kirschning, M. Jesberger, K. U. Schoning, *Synthesis-Stuttgart* **2001**, 507-540.
- [72] A. Trefzer, J. A. Salas, A. Bechthold, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 283-299.
- [73] C. A. Schnaitman, J. D. Klena, *Microbiol. Rev.* **1993**, *57*, 655-682.
- [74] X. M. M. He, H. W. Liu, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 701-754.
- [75] R. M. de Lederkremer, C. Marino, in *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, Vol. 61 (Ed.: D. Horton), Academic Press, **2007**, pp. 143-216.
- [76] H. Xi, M. Kurtoglu, T. J. Lampidis, *IUBMB Life* **2014**, *66*, 110-121.
- [77] E. Katzenellenbogen, N. A. Kocharova, G. V. Zatonsky, D. Witkowska, M. Bogulska, A. S. Shashkov, A. Gamian, Y. A. Knirel, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 2732-2738.
- [78] E. Romanowska, A. Romanowska, J. Dabrowski, M. Hauck, *FEBS Lett.* **1987**, *211*, 175-178.
- [79] E. Romanowska, A. Romanowska, C. Lugowski, E. Katzenellenbogen, *Eur. J. Biochem.* **1981**, *121*, 119-123.
- [80] S. Hanessian, in *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 21 (Eds.: M. L. Wolfrom, R. S. Tipson), Academic Press, **1967**, pp. 143-207.
- [81] F. Lombo, C. Olano, J. A. Salas, C. Mendez, *Complex Enzymes in Microbial Natural Product Biosynthesis, Part A: Overview Articles and Peptides* **2009**, *458*, 277-308.
- [82] G. J. Mcgarvey, M. Kimura, T. Oh, J. M. Williams, *J. Carbohydr. Chem.* **1984**, *3*, 125-188.
- [83] A. Zamojski, A. Banaszek, G. Gryniewicz, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1982**, *40*, 1-129.
- [84] S. Medina, M. C. Galan, in *Carbohydrate Chemistry: Volume 41*, Vol. 41, The Royal Society of Chemistry, **2016**, pp. 59-89.
- [85] B. Roman, J. W. Zbigniew, *Curr. Org. Chem.* **2014**, *18*, 1897-1912.
- [86] K. Kefurt, Kefurtov.Z, J. Jary, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1972**, *37*, 1035-1043.
- [87] K. Kefurt, Kefurtov.Z, J. Capkova, K. Capek, J. Jary, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1972**, *37*, 2985-&.
- [88] J. Jary, K. Kefurt, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1966**, *31*, 1803-&.
- [89] S. Signorella, L. F. Sala, *Rev. Roum. Chim.* **1998**, *43*, 41-44.
- [90] S. Servi, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5865-5867.
- [91] W. R. Roush, J. A. Straub, R. J. Brown, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5127-5136.
- [92] M. Petrzilka, J. I. Grayson, *Synthesis* **1981**, 753-786.
- [93] F. M. Hauser, R. P. Rhee, S. R. Ellenberger, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 2236-2240.
- [94] F. M. Hauser, S. R. Ellenberger, R. P. Rhee, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5041-5044.
- [95] P. Deshong, J. M. Leginus, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5355-5358.
- [96] P. Deshong, C. M. Dicken, J. M. Leginus, R. R. Whittle, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5598-5602.
- [97] R. R. Schmidt, *Pure Appl. Chem.* **1987**, *59*, 415-424.
- [98] R. R. Schmidt, *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 250-259.
- [99] F. P. J. T. Rutjes, T. M. Kooistra, H. Hiemstra, H. E. Schoemaker, *Synlett* **1998**, *1998*, 192-194.
- [100] B. Schmidt, T. Sattelkau, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 12991-13000.
- [101] F. E. McDonald, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 3103-3106.
- [102] F. E. McDonald, M. M. Gleason, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 350-352.
- [103] F. E. McDonald, M. M. Gleason, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6648-6659.
- [104] C. H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kajimoto, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 521-546.
- [105] S. L. Flitsch, in *Comprehensive Chirality* (Eds.: E. M. Carreira, H. Yamamoto), Elsevier, Amsterdam, **2012**, pp. 454-464.
-

- [106] A. Kirschning, A. F. W. Bechthold, J. Rohr, *Bioorganic Chemistry Deoxysugars, Polyketides and Related Classes: Synthesis, Biosynthesis, Enzymes* **1997**, 188, 1-84.
- [107] P. Clapés, J. Joglar, J. Bujons, in *Cascade Biocatalysis* (Eds.: S. Riva, W.-D. Fessner), Wiley-VCH, **2014**.
- [108] M. J. Kim, I. T. Lim, H. J. Kim, C. H. Wong, *Tetrahedron-Asymmetry* **1997**, 8, 1507-1509.
- [109] M. Petersen, M. T. Zannetti, W.-D. Fessner, in *Glycoscience Synthesis of Oligosaccharides and Glycoconjugates* (Eds.: H. Driguez, J. Thiem), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **1997**, pp. 87-117.
- [110] O. Eyrisch, W.-D. Fessner, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1639-1641.
- [111] S. Jarosz, *Curr. Org. Chem.* **2008**, 12, 985-994.
- [112] C. S. Poss, S. L. Schreiber, *Acc. Chem. Res.* **1994**, 27, 9-17.
- [113] M. T. Zannetti, C. Walter, M. Knorst, W.-D. Fessner, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 1882-1890.
- [114] M. Gutierrez, T. Parella, J. Joglar, J. Bujons, P. Clapes, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2011**, 47, 5762-5764.
- [115] A. Soler, M. L. Gutiérrez, J. Bujons, T. Parella, C. Minguillon, J. Joglar, P. Clapés, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, 357, 1787-1807.
- [116] A. Soler, X. Garrabou, K. Hernández, M. L. Gutiérrez, E. Busto, J. Bujons, T. Parella, J. Joglar, P. Clapés, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, 356, 3007-3024.
- [117] A. Szekrenyi, A. Soler, X. Garrabou, C. Guérard-Hélaine, T. Parella, J. Joglar, M. Lemaire, J. Bujons, P. Clapés, *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 12572-12583.
- [118] C. Guerard-Helaine, B. Legeret, C. Fernandes, V. Prevot, C. Forano, M. Lemaire, *New J. Chem.* **2011**, 35, 776-779.
- [119] G. Simon, T. Eljezi, B. Legeret, F. Charmantray, J. A. Castillo, C. Guerard-Helaine, M. Lemaire, M. Bouzon, P. Marliere, V. Helaine, L. Hecquet, *Chemcatchem* **2013**, 5, 784-795.
- [120] M. Rale, S. Schneider, G. A. Sprenger, A. K. Samland, W.-D. Fessner, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 2623-2632.
- [121] J. Fanton, F. Camps, J. A. Castillo, C. Guerard-Helaine, M. Lemaire, F. Charmantray, L. Hecquet, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 203-210.
- [122] C. Guerard-Helaine, M. Debacker, P. Clapes, A. Szekrenyi, V. Helaine, M. Lemaire, *Green Chem.* **2014**, 16, 1109-1113.
- [123] I. Sanchez-Moreno, V. Helaine, N. Poupard, F. Charmantray, B. Legeret, L. Hecquet, E. Garcia-Junceda, R. Wohlgemuth, C. Guerard-Helaine, M. Lemaire, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354, 1725-1730.
- [124] A. Szekrenyi, X. Garrabou, T. Parella, J. Joglar, J. Bujons, P. Clapés, *Nature Chem.* **2015**, 7, 724-729.
- [125] H. Ma, S. Engel, T. R. Enugala, D. Al-Smadi, C. Gautier, M. Widersten, *Biochemistry* **2018**, 57, 5877-5885.
- [126] X. Yang, L. Ye, A. Li, C. Yang, H. Yu, J. Gu, F. Guo, L. Jiang, F. Wang, H. Yu, *Catal. Sci. Technol.* **2017**, 7, 382-386.
- [127] D. Güclü, A. Szekrenyi, X. Garrabou, M. Kickstein, S. Junker, P. Clapés, W.-D. Fessner, *ACS Catalysis* **2016**, 6, 1848-1852.
- [128] R. Roldán, I. Sanchez-Moreno, T. Scheidt, V. Hélaine, M. Lemaire, T. Parella, P. Clapés, W.-D. Fessner, C. Guérard-Hélaine, *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 5005-5009.
- [129] R. Roldán, K. Hernandez, J. Joglar, J. Bujons, T. Parella, I. Sánchez-Moreno, V. Hélaine, M. Lemaire, C. Guérard-Hélaine, W.-D. Fessner, P. Clapés, *ACS Catalysis* **2018**, 8, 8804-8809.
- [130] S. Junker, R. Roldan, H.-J. Joosten, P. Clapés, W.-D. Fessner, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, 57, 10153-10157.
- [131] R. Roldán, K. Hernández, J. Joglar, J. Bujons, T. Parella, W.-D. Fessner, P. Clapés, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, 361, 2673-2687.
- [132] V. Laurent, V. Helaine, C. Vergne-Vaxelaire, L. Nauton, M. Traikia, J. L. Petit, M. Salanoubat, V. de Berardinis, M. Lemaire, C. Guerard-Helaine, *ACS Catalysis* **2019**, 9, 9508-9512.
-

-
- [133] S. A. Junker, PhD thesis, Technische Universität Darmstadt (Germany), **2018**.
- [134] S. Jennewein, M. Schürmann, M. Wolberg, I. Hilker, R. Luiten, M. Wubbolts, D. Mink, *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 537-548.
- [135] J. Liu, C.-C. Hsu, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2439-2441.
- [136] J. Liu, C.-H. Wong, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1404-1407.
- [137] D. Chambre, C. Guérard-Hélaine, E. Darii, A. Mariage, J.-L. Petit, M. Salanoubat, V. de Berardinis, M. Lemaire, V. Hélaine, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2019**, *55*, 7498-7501.
- [138] H. Sakuraba, K. Yoneda, K. Yoshihara, K. Satoh, R. Kawakami, Y. Uto, H. Tsuge, K. Takahashi, H. Hori, T. Ohshima, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 7427-7434.
- [139] K. Weissermel, H. J. Arpe, *Industrial Organic Chemistry*, 4th, Completely Revised ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2003**.
- [140] J. Ritz, H. Fuchs, H. Kieczka, W. C. Moran, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2011**.
- [141] W. Buijs, H. F. W. Wolters, R. P. M. Guit, F. P. W. Agterberg, Patent WO9837063 (A1), WO, **1998**.
- [142] A. I. Moskalenko, S. L. Belopukhov, A. A. Ivlev, V. I. Boev, *Russ. J. Org. Chem.* **2011**, *47*, 1091-1096.
- [143] P. Purder, Bachelor thesis, Technische Universität Darmstadt (Germany), **2015**.
- [144] S. Michaud, J. Viala, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 3019-3024.
- [145] H. Suemune, M. Hizuka, T. Kamashita, K. Sakai, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 1379-1381.
- [146] W.-D. Fessner, C. Walter, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 643-645.
- [147] D. H. R. Barton, D. Crich, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1986**, 1603-1611.
- [148] K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K. S. Jeong, H. L. Kwong, K. Morikawa, Z. M. Wang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768-2771.
- [149] Y. F. Shealy, J. D. Clayton, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3075-3083.
- [150] M. J. Cook, T. Rovis, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9302-9303.
- [151] C. A. Grob, H. R. Pfaendler, *Helv. Chim. Acta* **1970**, *53*, 2156-2159.
- [152] M. A. Kinsella, V. J. Kalish, S. M. Weinreb, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 105-111.
- [153] Z. Chen, R. L. Halterman, *Organometallics* **1994**, *13*, 3932-3942.
- [154] K. Heynes, W.-P. Trautwein, H. Paulsen, *Chem. Ber.* **1963**, *96*, 3195-3199.
- [155] G. Limberg, J. Thiem, *Synthesis* **1994**, *1994*, 317-321.
- [156] N. Cramer, M. Buchweitz, S. Laschat, W. Frey, A. Baro, D. Mathieu, C. Richter, H. Schwalbe, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 2488-2503.
- [157] P. M. Henry, M. Davies, G. Ferguson, S. Phillips, R. Restivo, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1974**, 112-113.
- [158] R. M. Moriarty, M. P. Duncan, R. K. Vaid, O. M. Prakash, *Org. Synth.* **1990**, Vol. 68, 175-179.
- [159] Z.-Q. Wang, C.-G. Feng, M.-H. Xu, G.-Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5336-5337.
- [160] S. H. Bertz, J. M. Cook, A. Gawish, U. Weiss, *Org. Synth.* **1986**, *64*, 27.
- [161] R. Gagnon, G. Grogan, S. M. Roberts, R. Villa, A. J. Willetts, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 1505-1511.
- [162] T. Noel, K. Vandyck, J. Van der Eycken, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 12961-12967.
- [163] S. H. Bertz, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3585-3592.
- [164] C. F. Tormena, V. Lacerda Jr., K. T. De Oliveg, *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 112-118.
- [165] A. P. Marchand, G. M. Reddy, *Synthesis* **1991**, *1991*, 198-200.
- [166] Z. Paryzek, H. Koenig, B. Tabaczka, *Synthesis* **2003**, *2003*, 2023-2026.
- [167] R. C. Cookson, E. Crundwell, R. R. Hill, J. Hudec, *J. Chem. Soc. (Resumed)* **1964**, 3062-3075.
- [168] R. Rathore, C. L. Burns, M. I. Deselnicu, *Org. Synth.* **2005**, *82*, 1-9.
-

- [169] A. Pelšs, N. Gandhamsetty, J. R. Smith, D. Mailhol, M. Silvi, A. J. A. Watson, I. Perez-Powell, S. Prévost, N. Schützenmeister, P. R. Moore, V. K. Aggarwal, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 9542-9545.
- [170] J. R. Durrwachter, C. H. Wong, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4175-4181.
- [171] S. J. Angyal, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1969**, *8*, 157-166.
- [172] X.-H. Chen, S.-W. Luo, Z. Tang, L.-F. Cun, A.-Q. Mi, Y.-Z. Jiang, L.-Z. Gong, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 689-701.
- [173] C. G. Wermuth, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2406-2408.
- [174] A. Manzocchi, F. Astori, E. Santaniello, *Synthesis* **1983**, *1983*, 324-325.
- [175] L. Badovskaya, *Khim. Geterotsikl. Soedin.* **1978**, 1314-1319.
- [176] A. Saeed, M. Qasim, *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28*, 185-190.
- [177] Y. S. Rao, *Chem. Rev.* **1964**, *64*, 353-388.
- [178] R. Cao, C. Liu, L. Liu, *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, *28*, 215-216.
- [179] S. Chang, Y. B. Sun, X. R. Zhang, L. L. Dong, H. Y. Zhu, H. W. Lai, D. Wang, *Appl. Organomet. Chem.* **2018**, *32*, e3970.
- [180] G. A. Molander, L. N. Cavalcanti, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 623-630.
- [181] Y.-H. Shi, Z. Wang, Y. Shi, W.-P. Deng, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 3649-3653.
- [182] Y. Tian, D.-H. Suk, F. Cai, D. Crich, A. D. Mesecar, *Biochemistry* **2008**, *47*, 12434-12447.
- [183] S. Lee, M. Bae, J. In, J. H. Kim, S. Kim, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 254-257.
- [184] T. Sifferlen, A. Boller, A. Chardonneau, E. Cottreel, J. Hoecker, H. Aissaoui, J. T. Williams, C. Brotschi, B. Heidmann, R. Siegrist, J. Gatfield, A. Treiber, C. Brisbare-Roch, F. Jenck, C. Boss, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 1201-1208.
- [185] K. J. Shea, E. Wada, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5715-5719.
- [186] Y. Watanabe, M. Yamashita, T.-a. Mitsudo, M. Tanaka, Y. Takegami, *Tetrahedron Lett.* **1973**, *14*, 3535-3536.
- [187] B. Simoneau, P. Brassard, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 1015-1022.
- [188] S. Ducher, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1959**, 1259-1267.
- [189] P. Yates, E. G. Lewars, P. H. McCabe, *Can. J. Chem.* **1972**, *50*, 1548-1556.
- [190] J. J. Bourguignon, C. G. Wermuth, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4889-4894.
- [191] O. M. Moradei, L. A. Paquette, *Org. Synth.* **2003**, *80*, 60-74.
- [192] R. Datrika, S. R. Kallam, S. R. Khobare, V. S. Gajare, M. Kommi, H. Rama Mohan, V. Siddaiah, T. V. Pratap, *Tetrahedron: Asymmetry* **2016**, *27*, 603-607.
- [193] M. S. Reddy, Y. K. Kumar, N. Thirupathi, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 824-827.
- [194] A. G. M. Barrett, H. G. Sheth, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 5017-5022.
- [195] W. A. May, R. J. Peterson, S. S. Chang, *J. Food Sci.* **1978**, *43*, 1248-1252.
- [196] G. Ohloff, in *Progress in Organic Chemistry*, Vol. 35, Springer Verlag: Wien, **1978**.
- [197] K. Mori, in *Techniques in Pheromone Research* (Eds.: H. E. Hummel, T. A. Miller), Springer Verlag: New York, **1984**.
- [198] Y. Iino, A. Tanaka, K. Yamashita, *Agricultural and Biological Chemistry* **1972**, *36*, 2505-2509.
- [199] S. S. Canan Koch, A. R. Chamberlin, in *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 16 (Ed.: R. Atta ur), Elsevier, **1995**, pp. 687-725.
- [200] S. P. Gunasekera, M. Gunasekera, R. E. Longley, G. K. Schulte, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4912-4915.
- [201] E. ter Haar, R. J. Kowalski, E. Hamel, C. M. Lin, R. E. Longley, S. P. Gunasekera, H. S. Rosenkranz, B. W. Day, *Biochemistry* **1996**, *35*, 243-250.
- [202] D. T. Hung, J. Chen, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 287-293.
- [203] S. J. Shaw, K. F. Sundermann, M. A. Burlingame, D. C. Myles, B. S. Freeze, M. Xian, I. Brouard, A. B. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6532-6533.

-
- [204] A. B. Smith, M. J. LaMarche, M. Falcone-Hindley, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 695-698.
- [205] W. L. F. Armarego, C. L. L. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals*, Elsevier, **2003**.
- [206] *Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie*, Merck AG, Darmstadt, **1970**.
- [207] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176-2179.
- [208] F. W. Studier, *Protein Expression Purif.* **2005**, *41*, 207-234.
- [209] H. Sano, S. Sugai, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 4635-4646.
- [210] A. P. Dishington, D. C. Humber, R. J. Stoodley, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 57-65.
- [211] S. Kotha, E. Brahmachary, R. Sivakumar, A. Joseph, N. Sreenivasachary, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4497-4500.
- [212] M. Tomizawa, M. Shibuya, Y. Iwabuchi, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1829-1831.
- [213] M. M. Walker, C. G. Goodman, J. S. Johnson, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 9385-9388.
- [214] B. M. Trost, D. J. Michaelis, M. I. Truica, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4516-4519.
- [215] E. G. Ankudey, H. F. Olivo, T. L. Peeples, *Green Chem.* **2006**, *8*, 923-926.
- [216] P. Li, J. Yang, K. Zhao, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2259-2263.
- [217] V. Singh, P. T. Deota, *Synth. Commun.* **1988**, *18*, 617-624.
- [218] Y. Morita, H. Tokuyama, T. Fukuyama, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4337-4340.
- [219] Y. Nagao, W. M. Dai, M. Ochiai, M. Shiro, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5211-5217.
- [220] Y. Adriaenssens, D. Jimenez Fernandez, L. Vande Walle, F. Elvas, J. Joossens, A. Lambeir, K. Augustyns, M. Lamkanfi, P. Van der Veken, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 7456-7473.
- [221] Y.-M. Chung, C.-K. Wei, D.-W. Chuang, M. El-Shazly, C.-T. Hsieh, T. Asai, Y. Oshima, T.-J. Hsieh, T.-L. Hwang, Y.-C. Wu, F.-R. Chang, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3866-3872.
- [222] A.-K. C. Schmidt, C. B. W. Stark, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5788-5791.
- [223] R. Ballini, M. Petrini, V. Polzonetti, *Synthesis* **1992**, 1992, 355-357.
- [224] *Pure Appl. Chem.* **1984**, *56*, 595-624.
-

8 Spektrenanhang

Im Folgenden sind GC- und HPLC-Analysen einiger ausgewählter Beispiele sowie ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von Endverbindungen dargestellt.

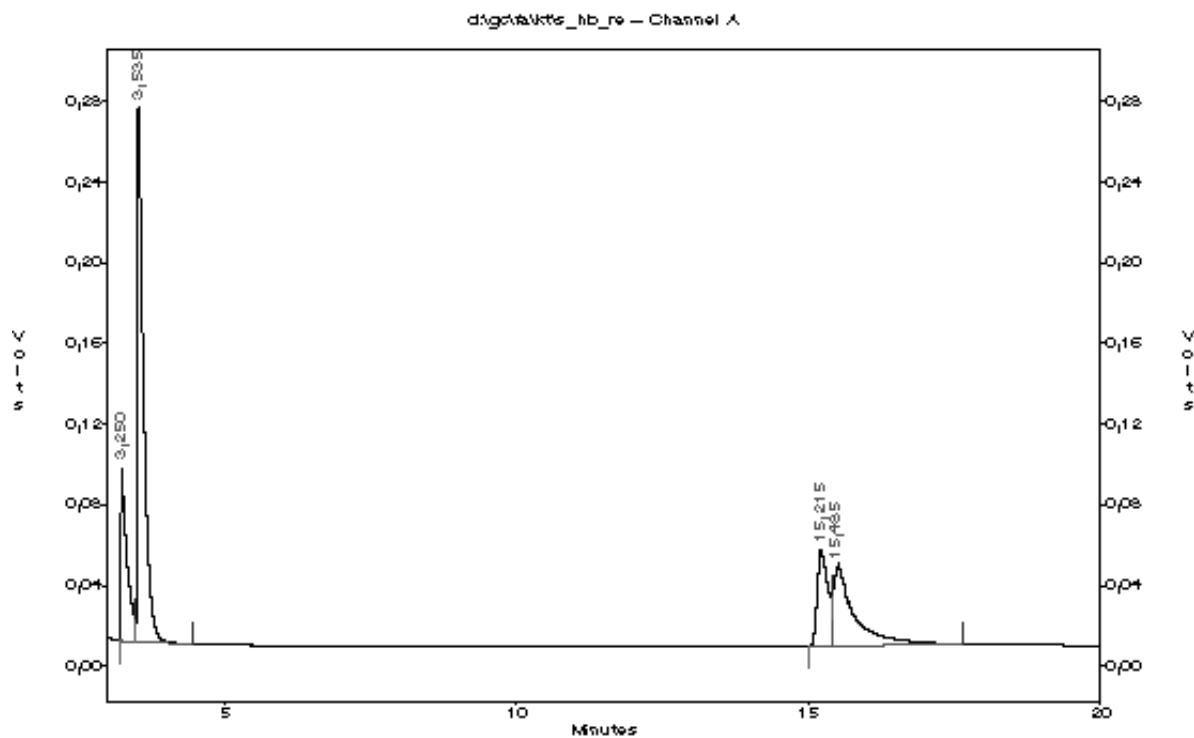


Abbildung 39. GC-Analyse des racemischen 4,4-Dimethoxybutan-2-yl acetats (*rac*-67). (*S*)-67 bei $t_R = 15.2$ min und (*R*)-67 bei $t_R = 15.5$ min.

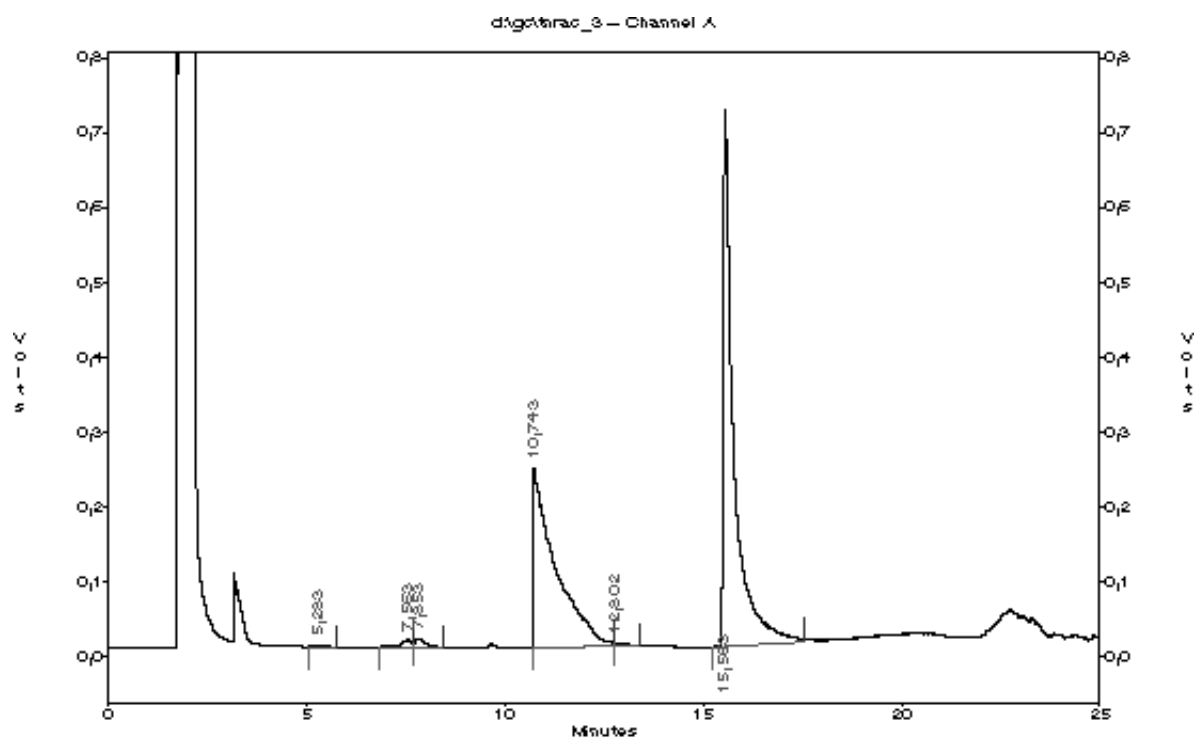


Abbildung 40. GC-Analyse der kinetischen Racematspaltung von *rac*-4,4-Dimethoxybutan-2-ol (*rac*-67) nach 26 h. (S)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol ((S)-66) bei $t_R = 10.7$ min und (R)-4,4-Dimethoxybutan-2-yl acetat ((R)-67) bei $t_R = 15.6$ min.

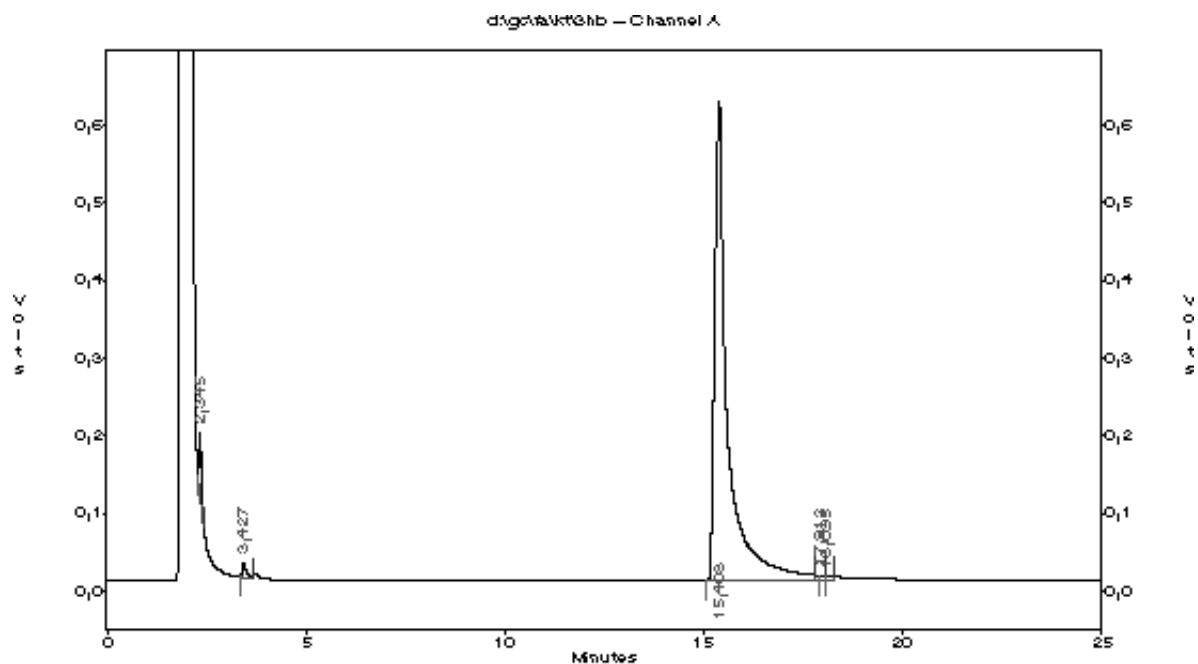
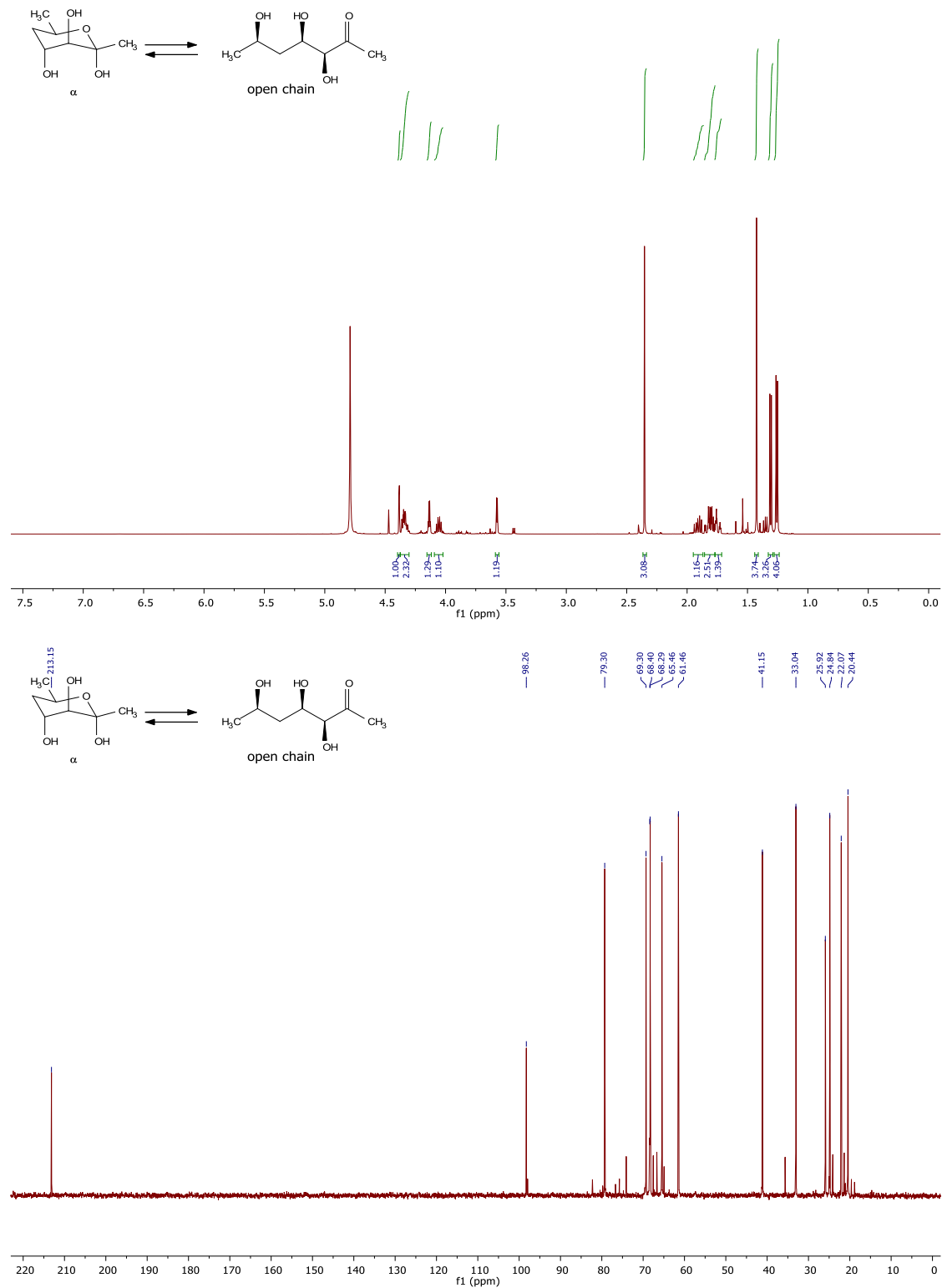


Abbildung 41. GC-Analyse von (S)-4,4-Dimethoxybutan-2-yl acetat ((S)-67) bei $t_R = 15.4$ min nach der Acetylierung von (S)-4,4-Dimethoxybutan-2-ol ((S)-66).

Abbildung 42. ^1H - (300.1 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, D_2O , unten) von **159**.

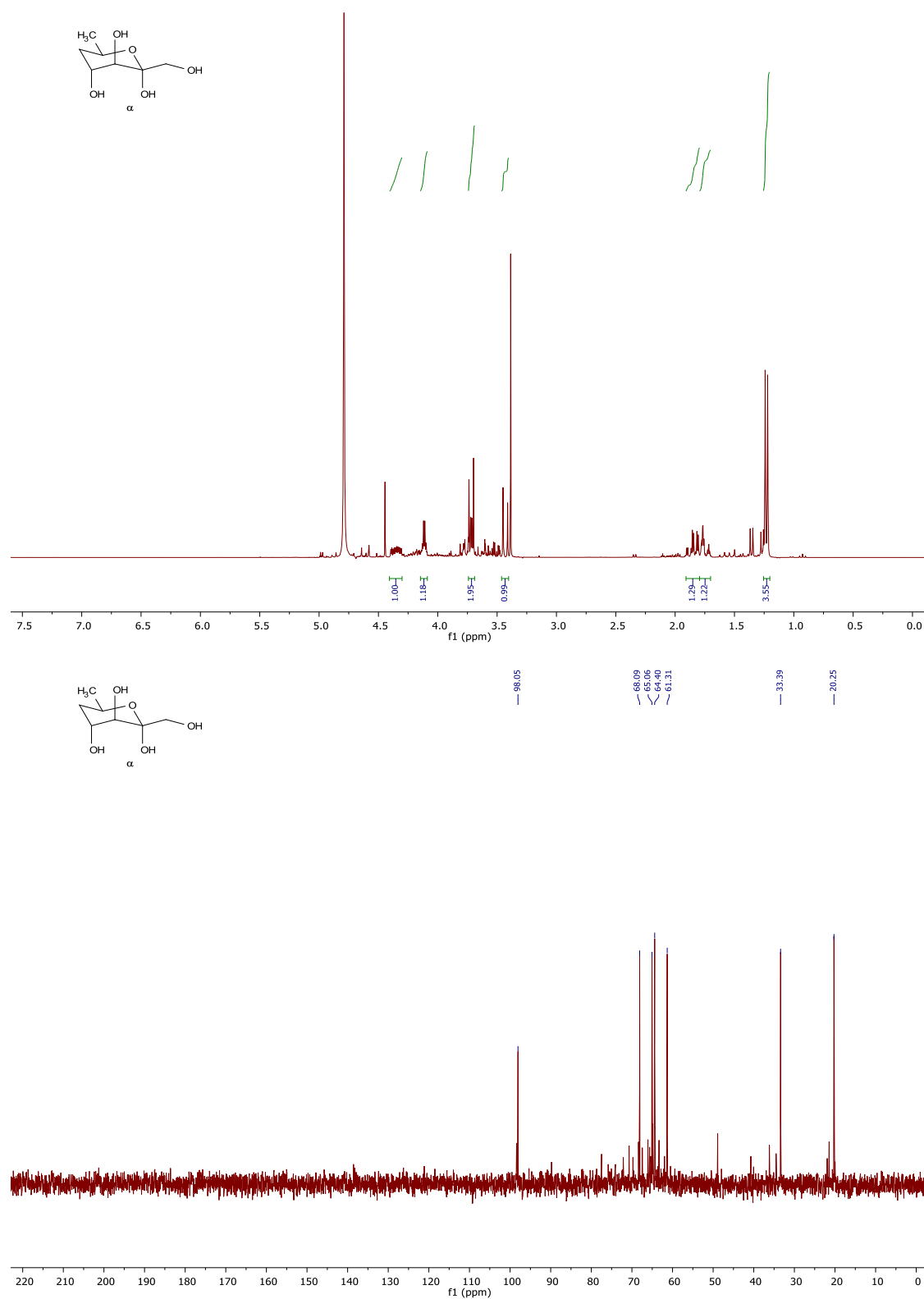


Abbildung 43. ^1H - (300.1 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, D_2O , unten) von 160.

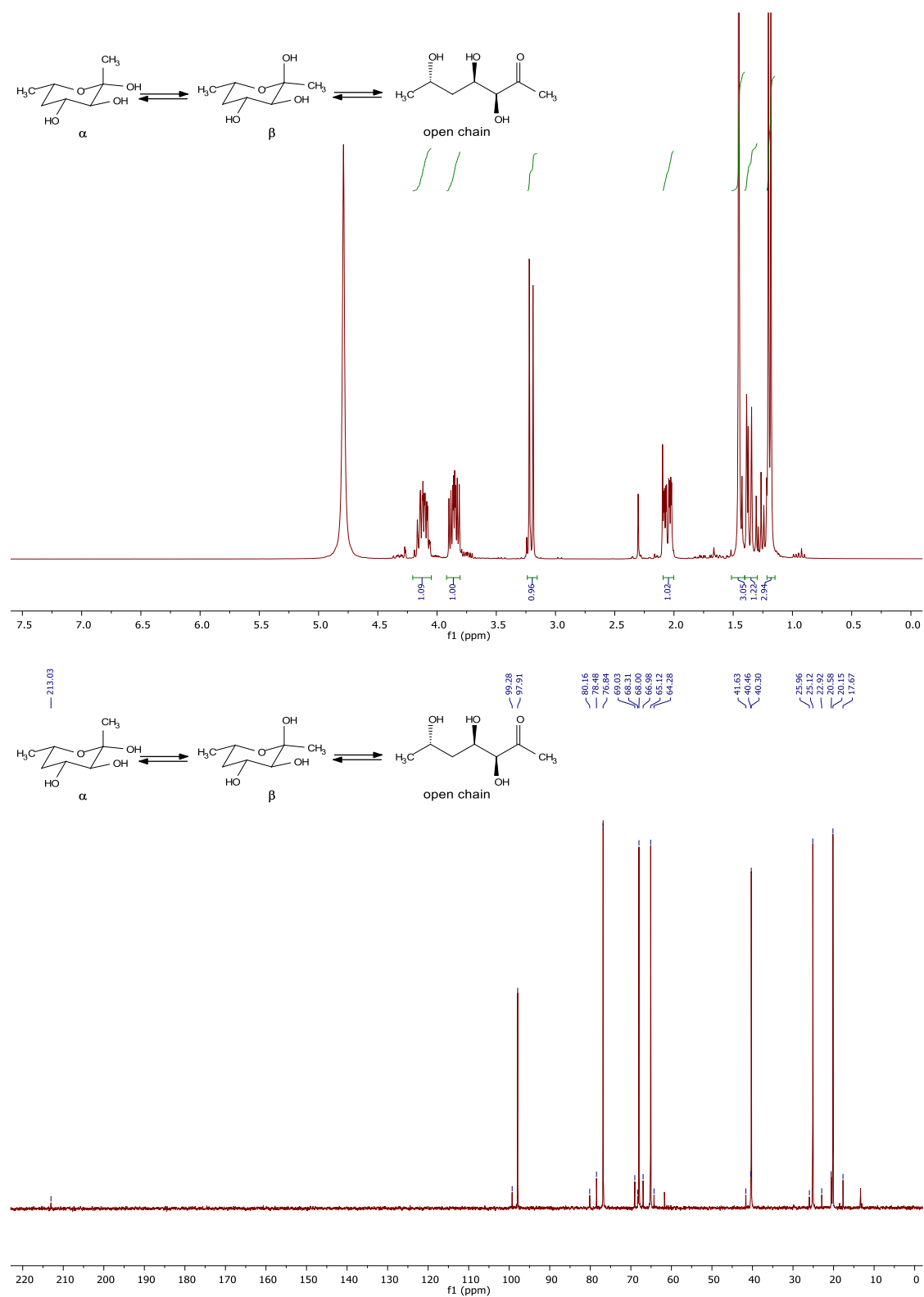


Abbildung 44. ^1H - (300.1 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, D_2O , unten) von **161**.

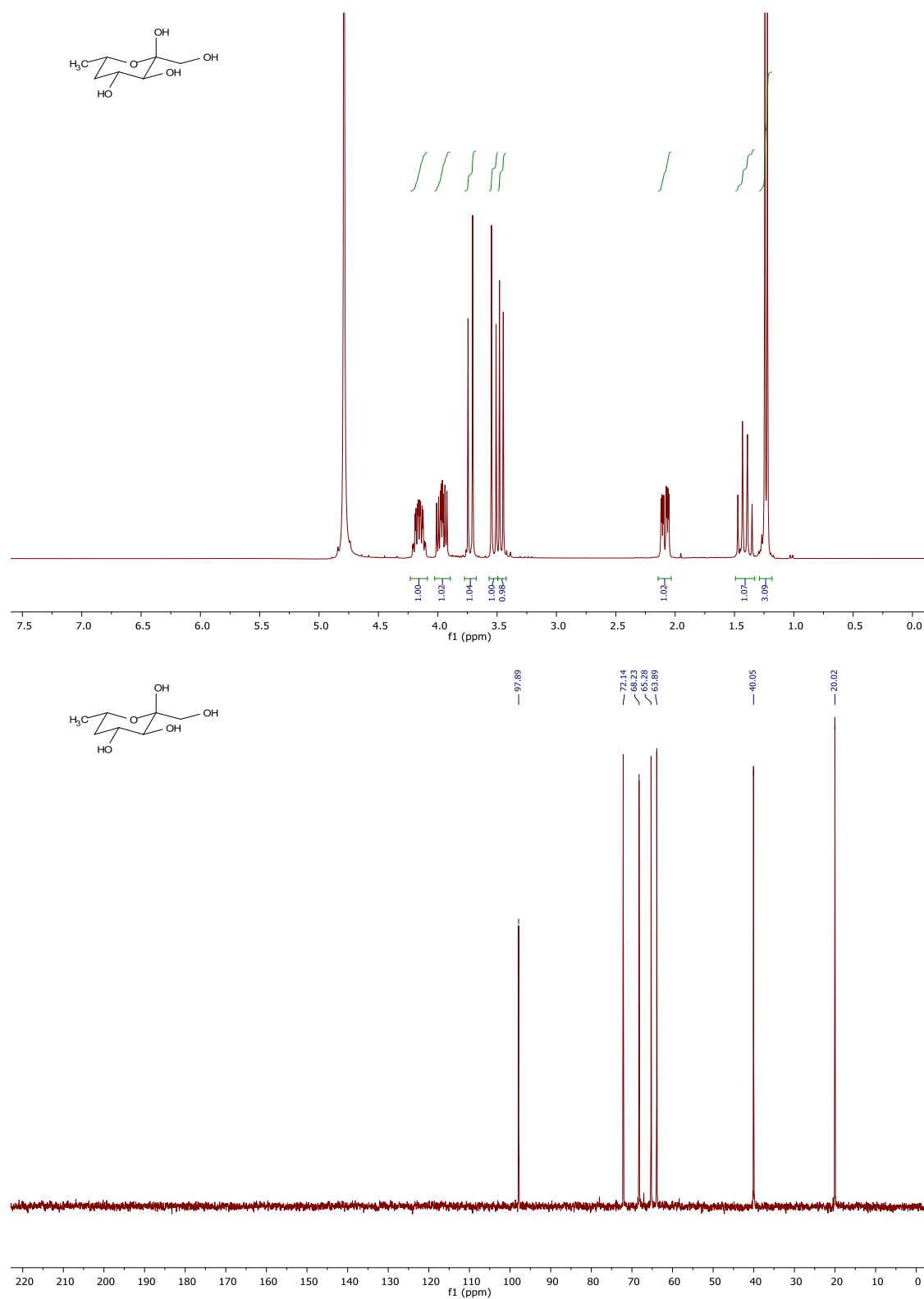
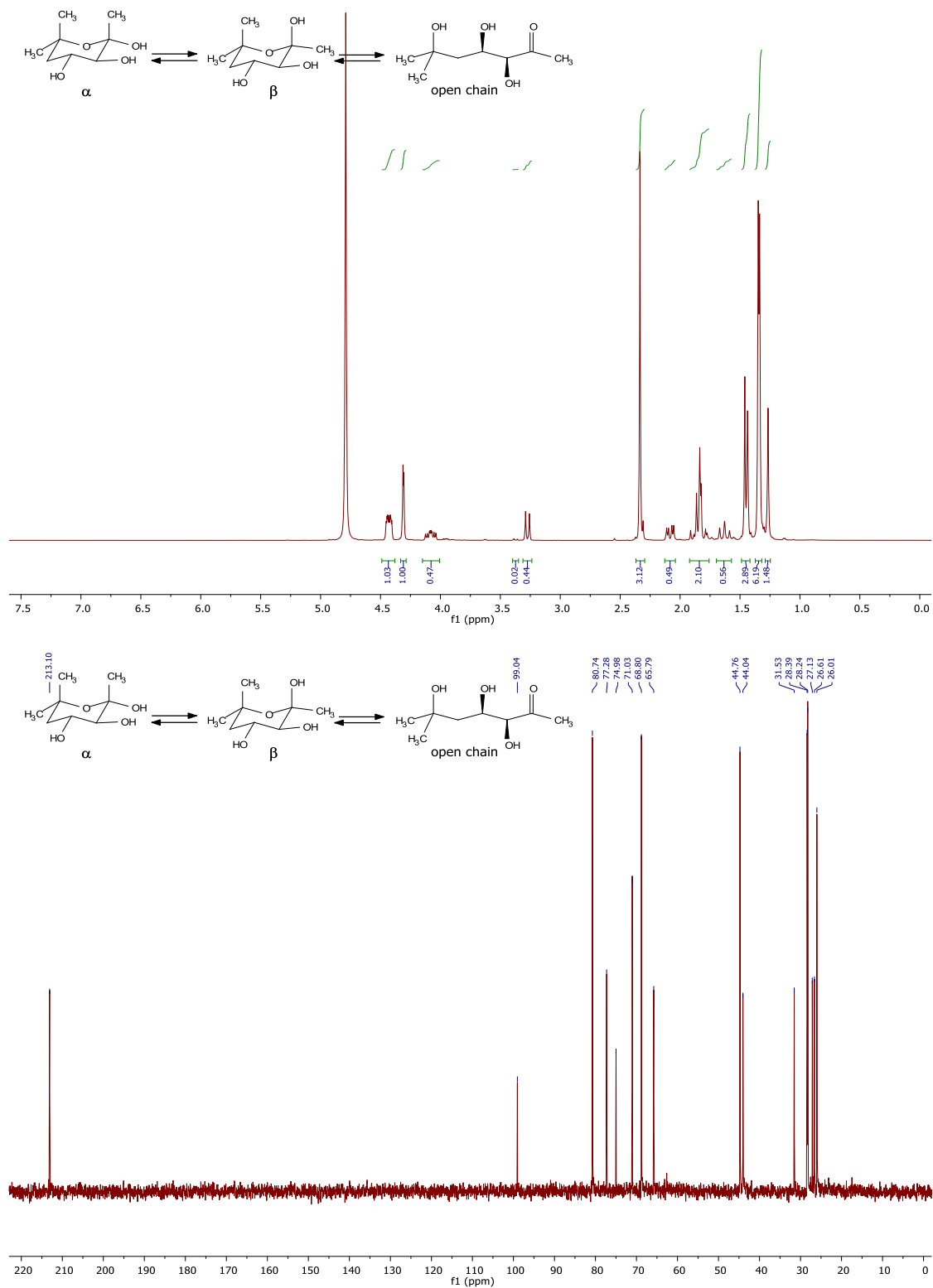


Abbildung 45. ^1H - (300.1 MHz, D_2O , unten) und ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, D_2O , unten) von **162**.

Abbildung 46. ^1H - (300.1 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, D_2O , unten) von 150.

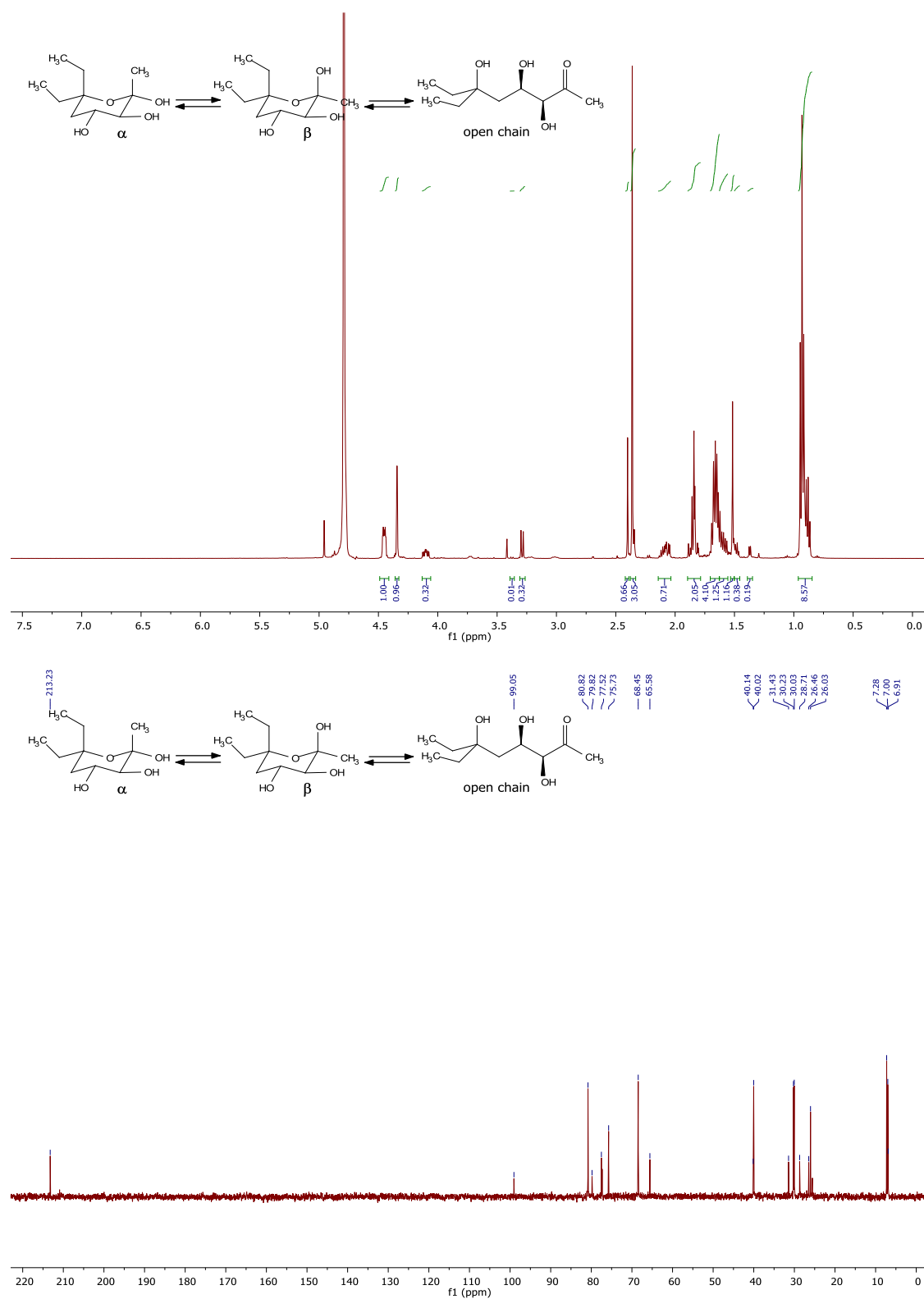
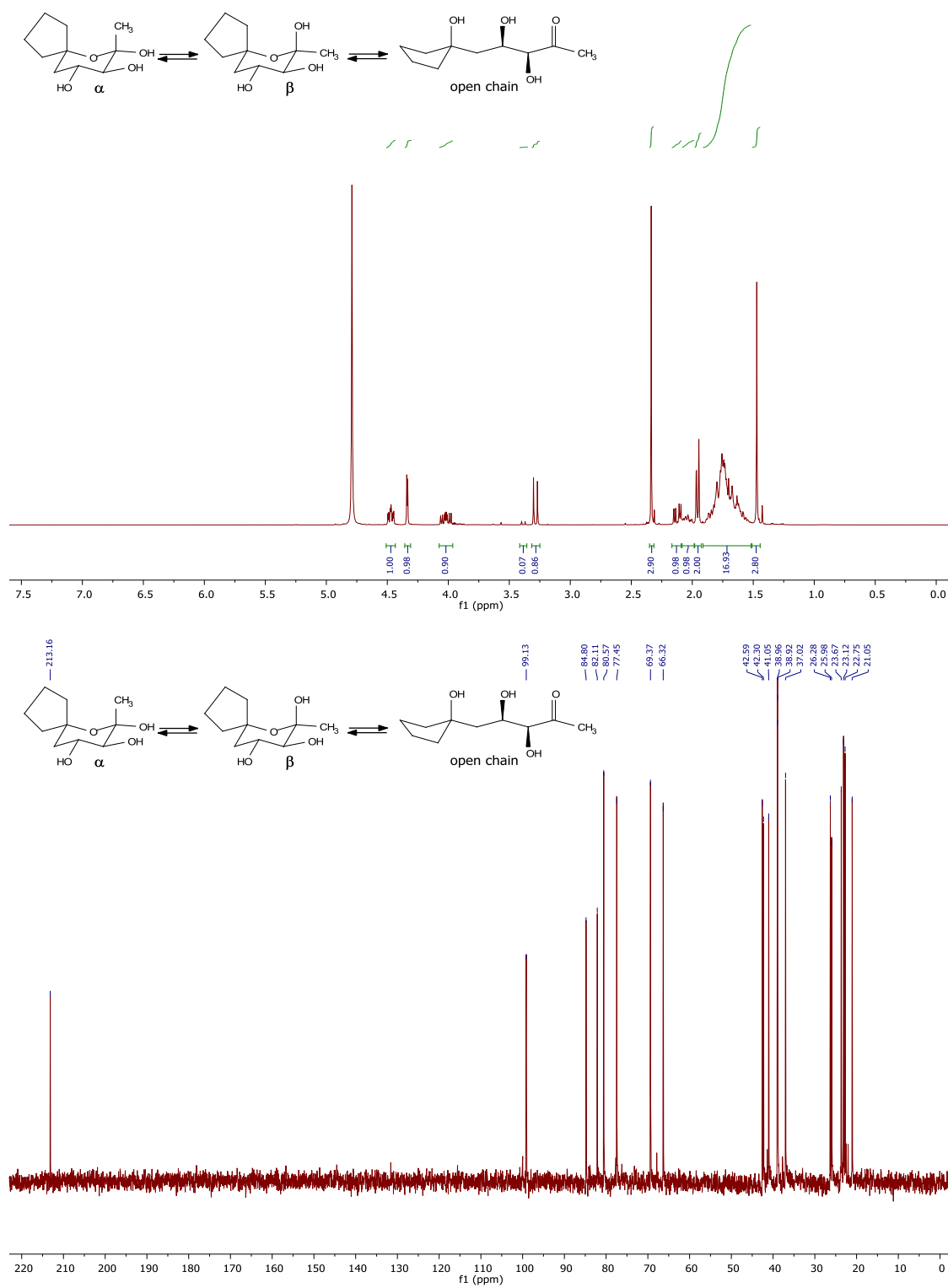


Abbildung 47. ^1H - (300.1 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, D_2O , unten) von 154.

Abbildung 48. ^1H - (300.1 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, D_2O , unten) von 156.

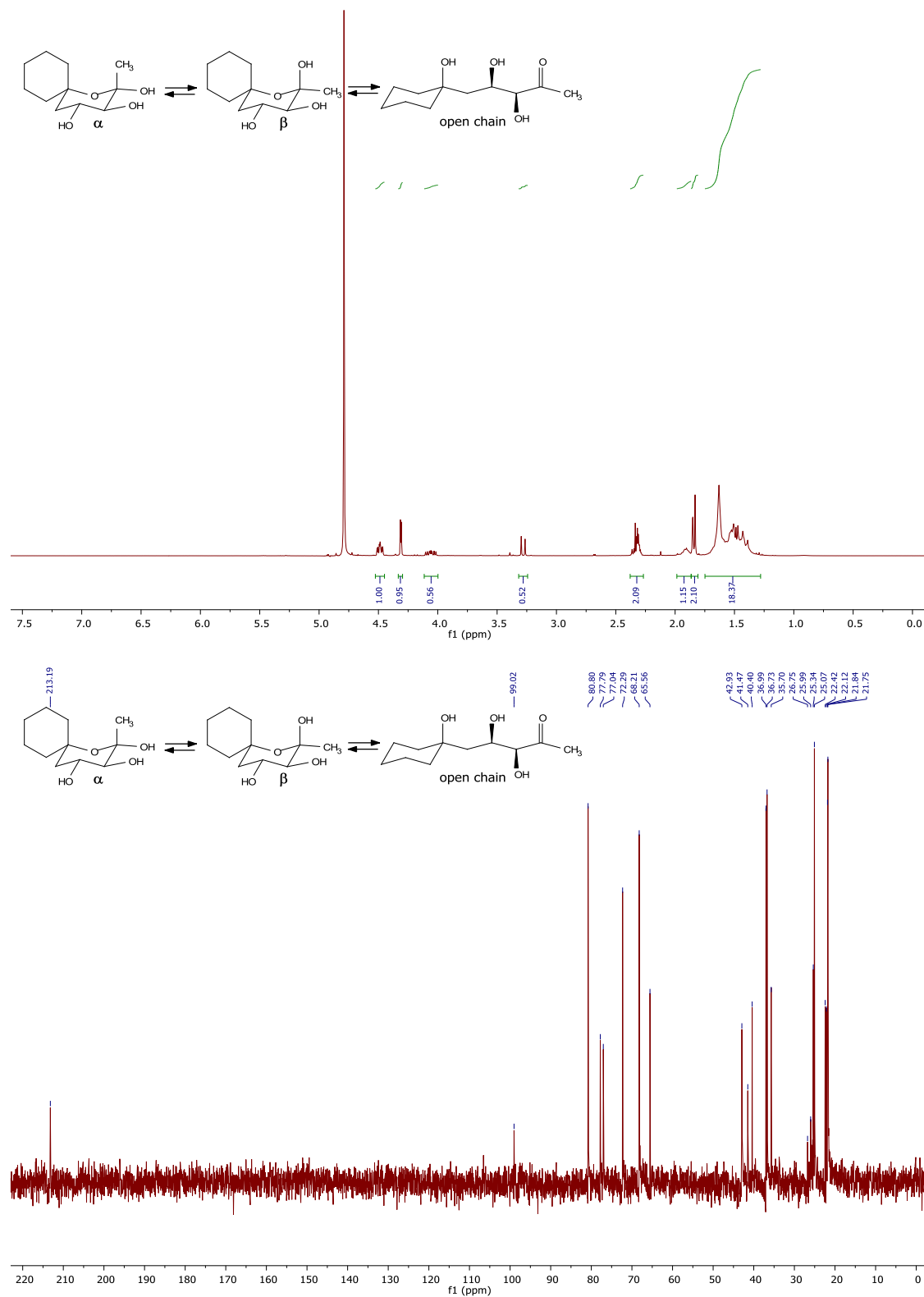


Abbildung 49. ^1H - (300.1 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, D_2O , unten) von 164.

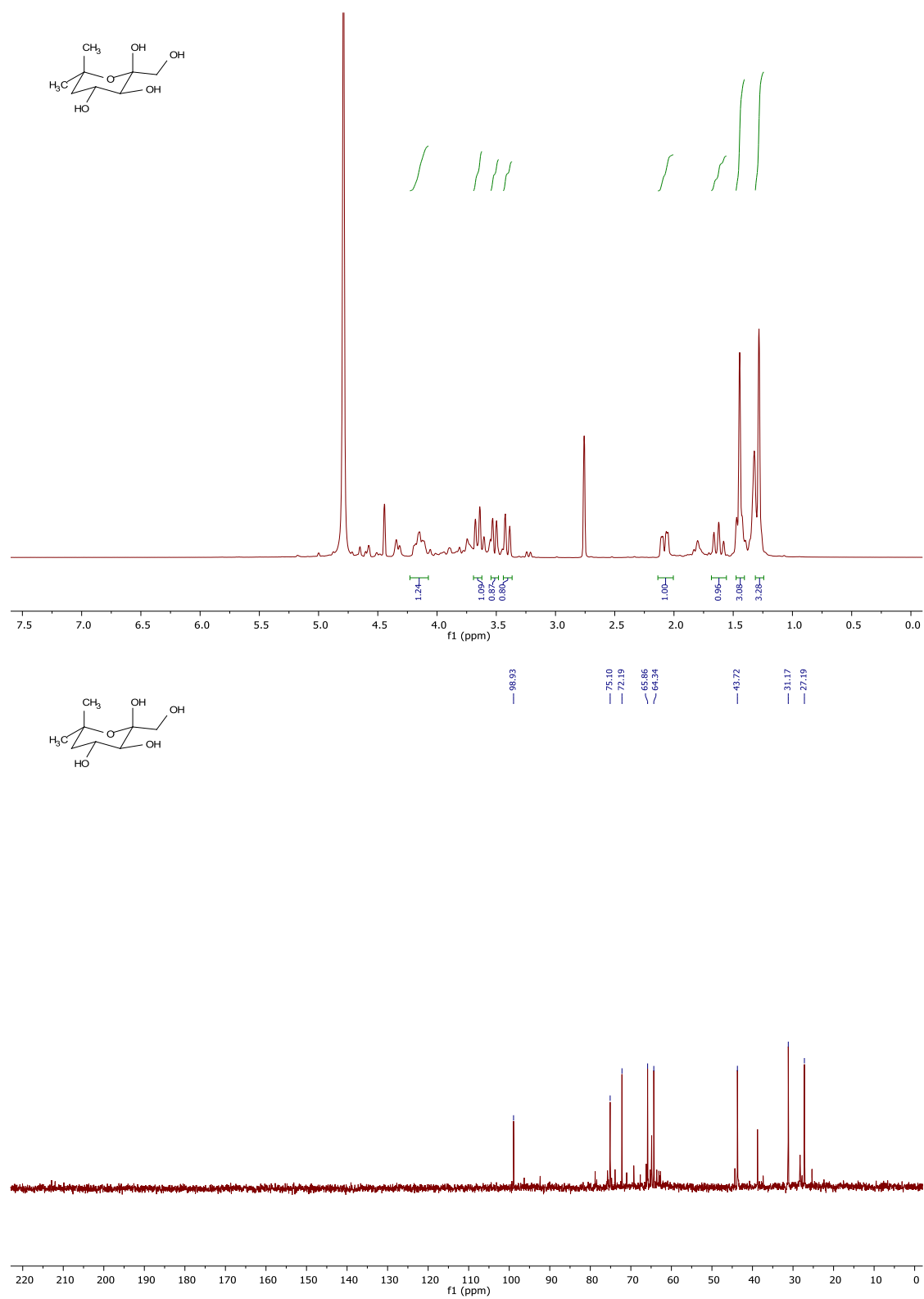
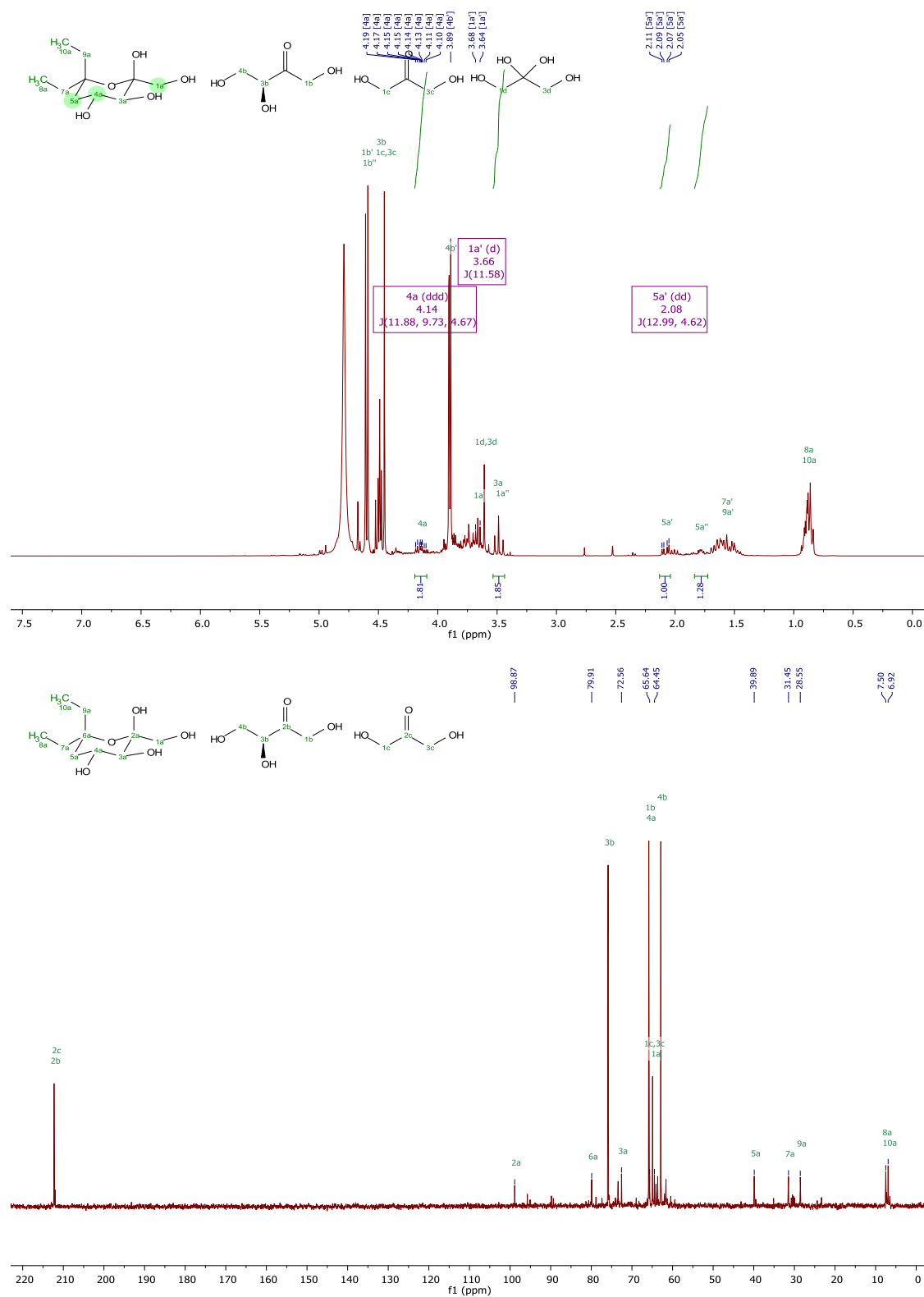
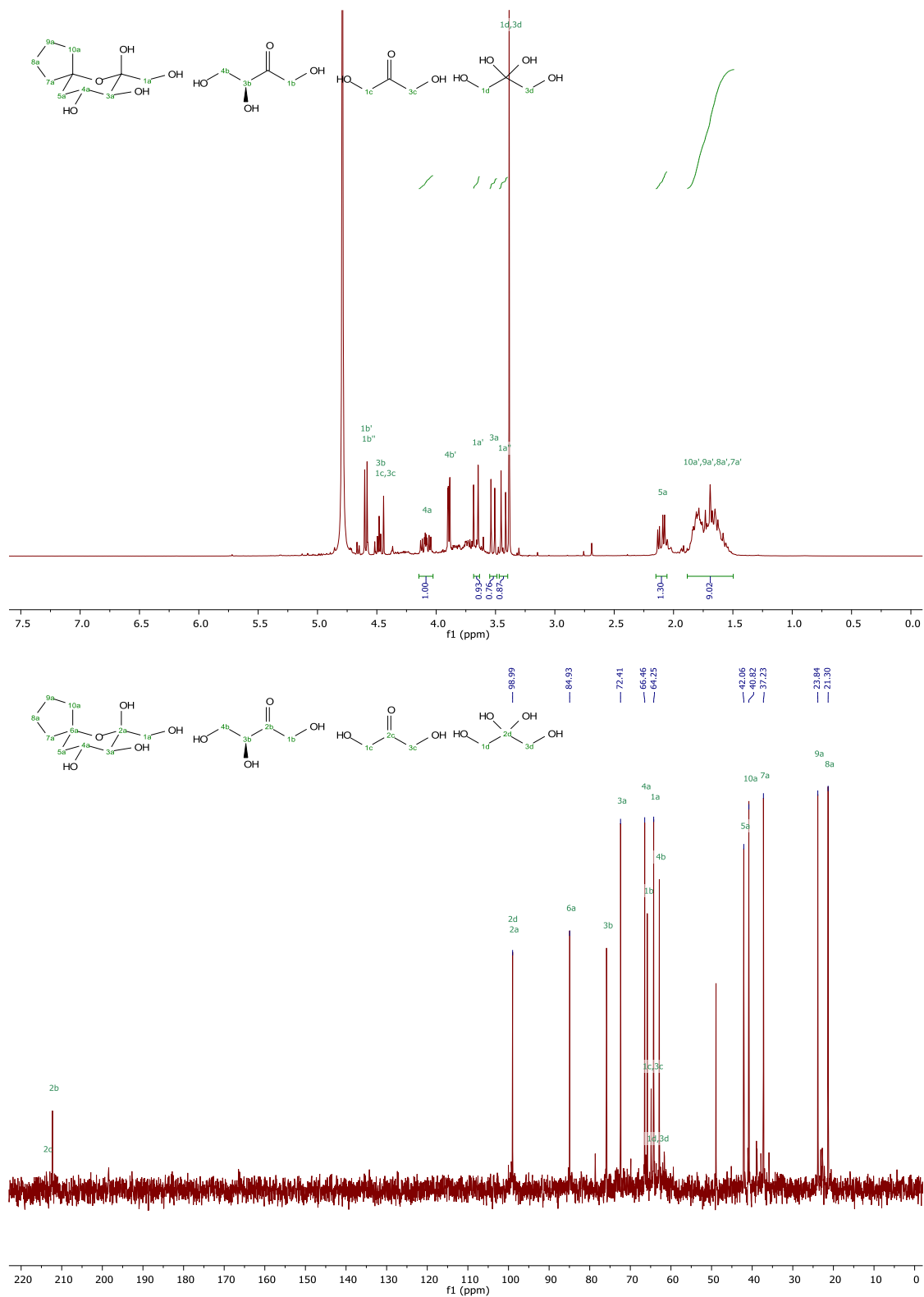


Abbildung 50. ^1H - (300.1 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, D_2O , unten) von **152**.

Abbildung 51. ^1H - (300.1 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, D_2O , unten) von 155.

Abbildung 52. ¹H- (300.1 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, D₂O, unten) von 157.



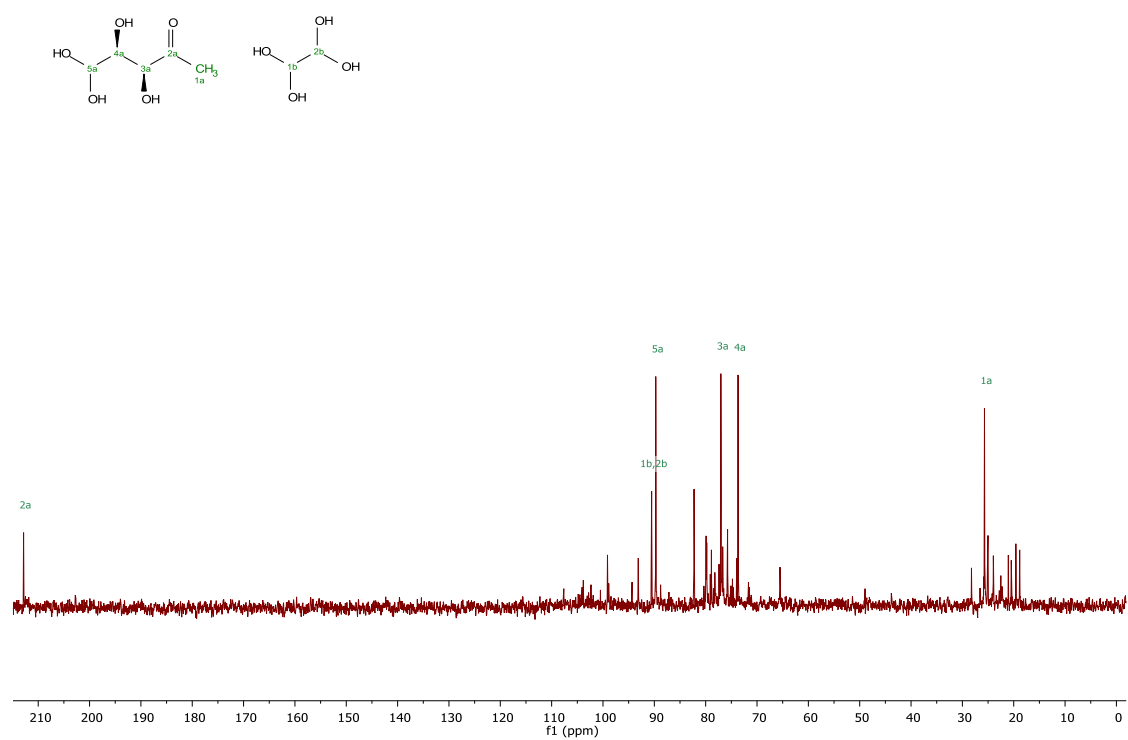
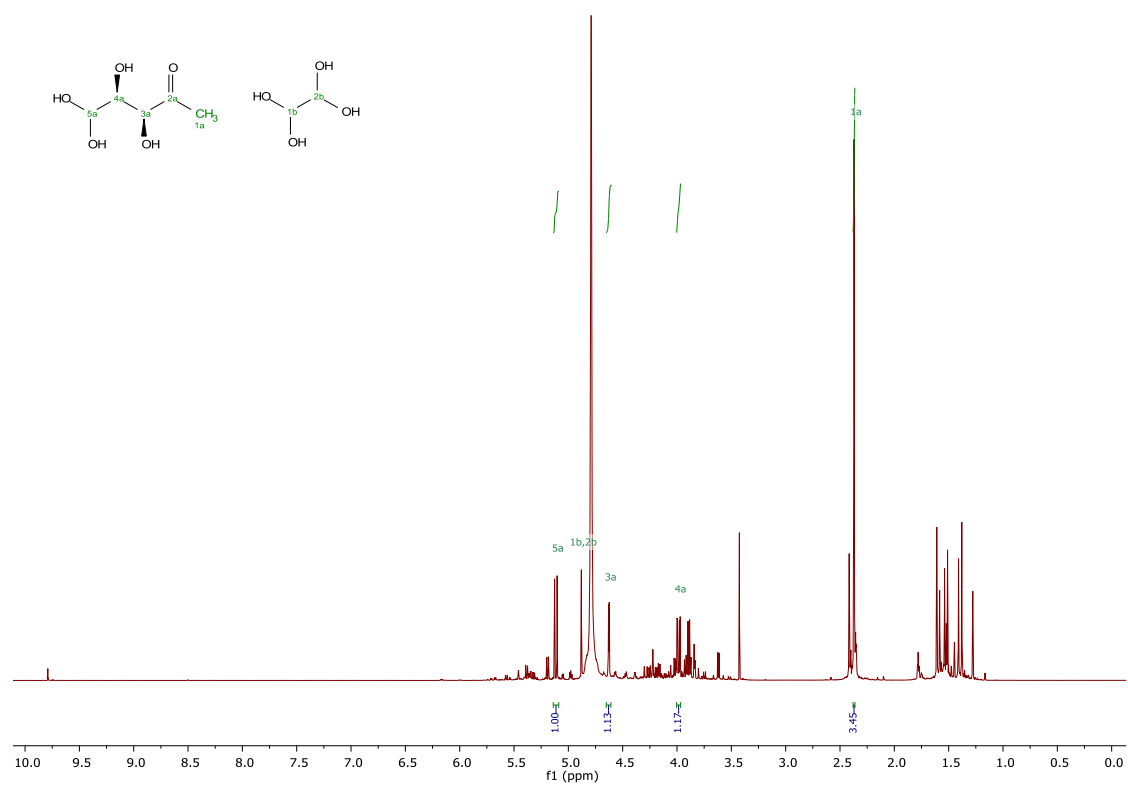


Abbildung 54. ^1H - (300.1 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, D_2O , unten) von **165a** (80% Reinheit).

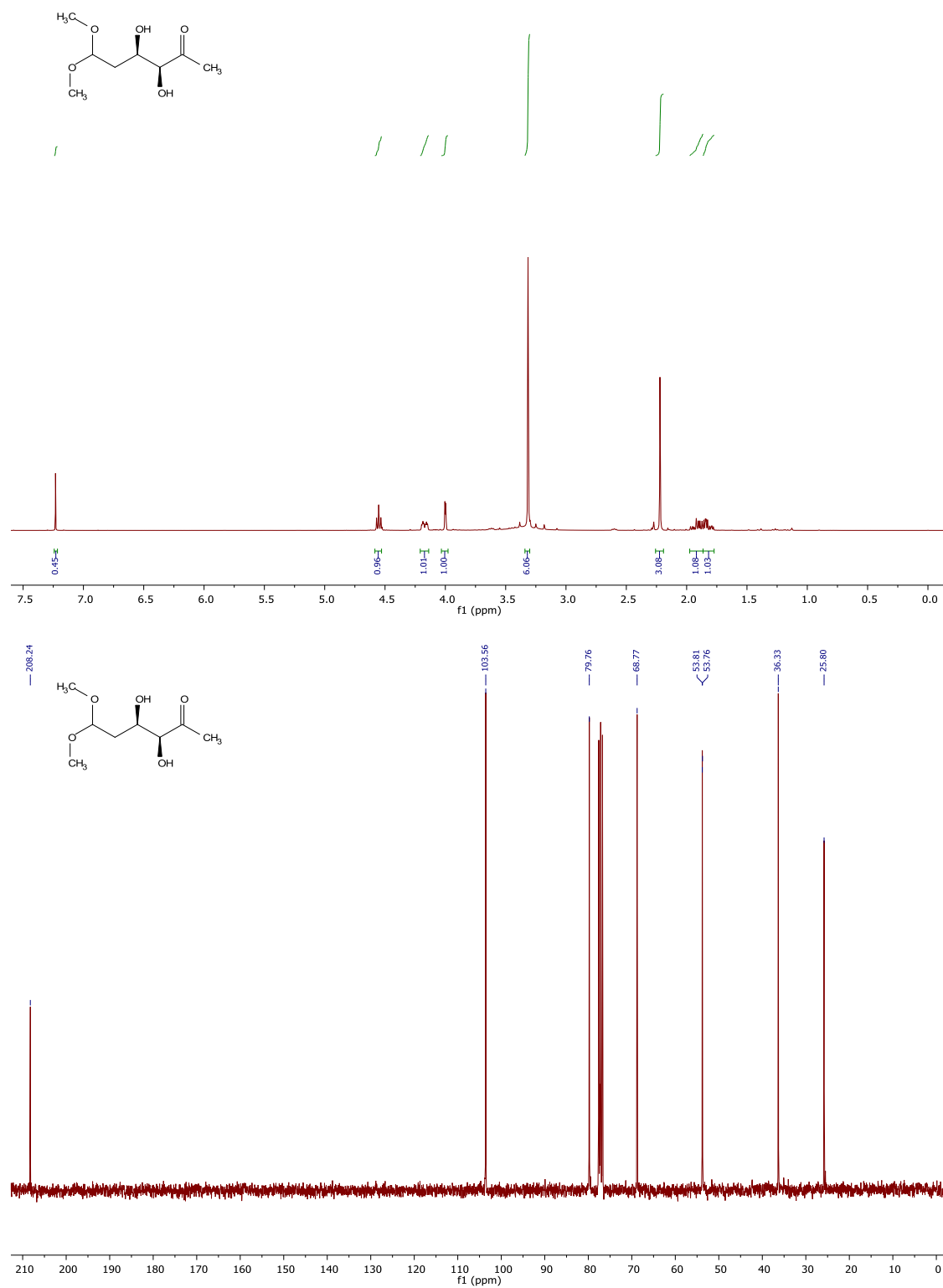


Abbildung 55. ¹H- (300.1 MHz, CDCl₃, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, CDCl₃, unten) von 170.

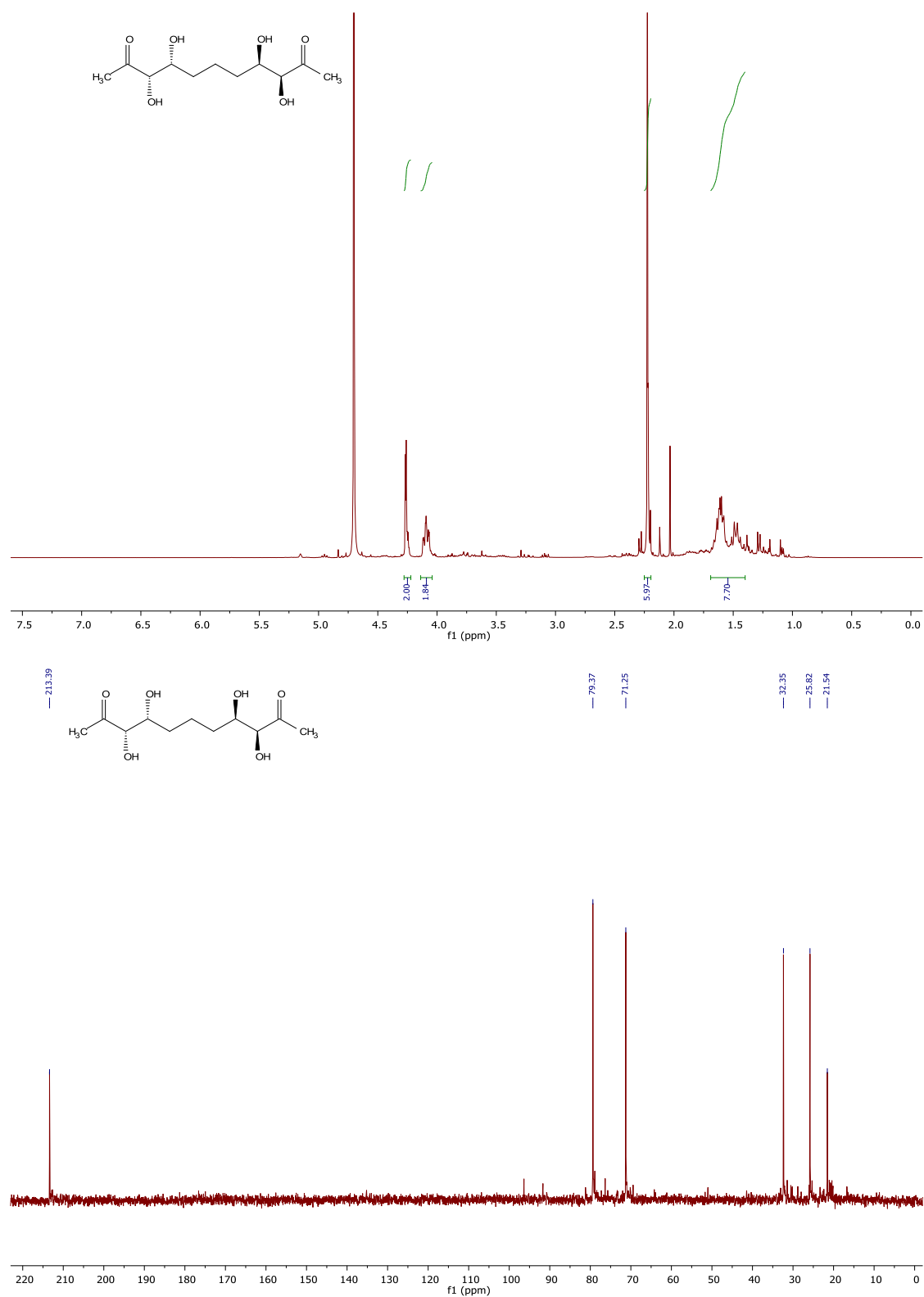
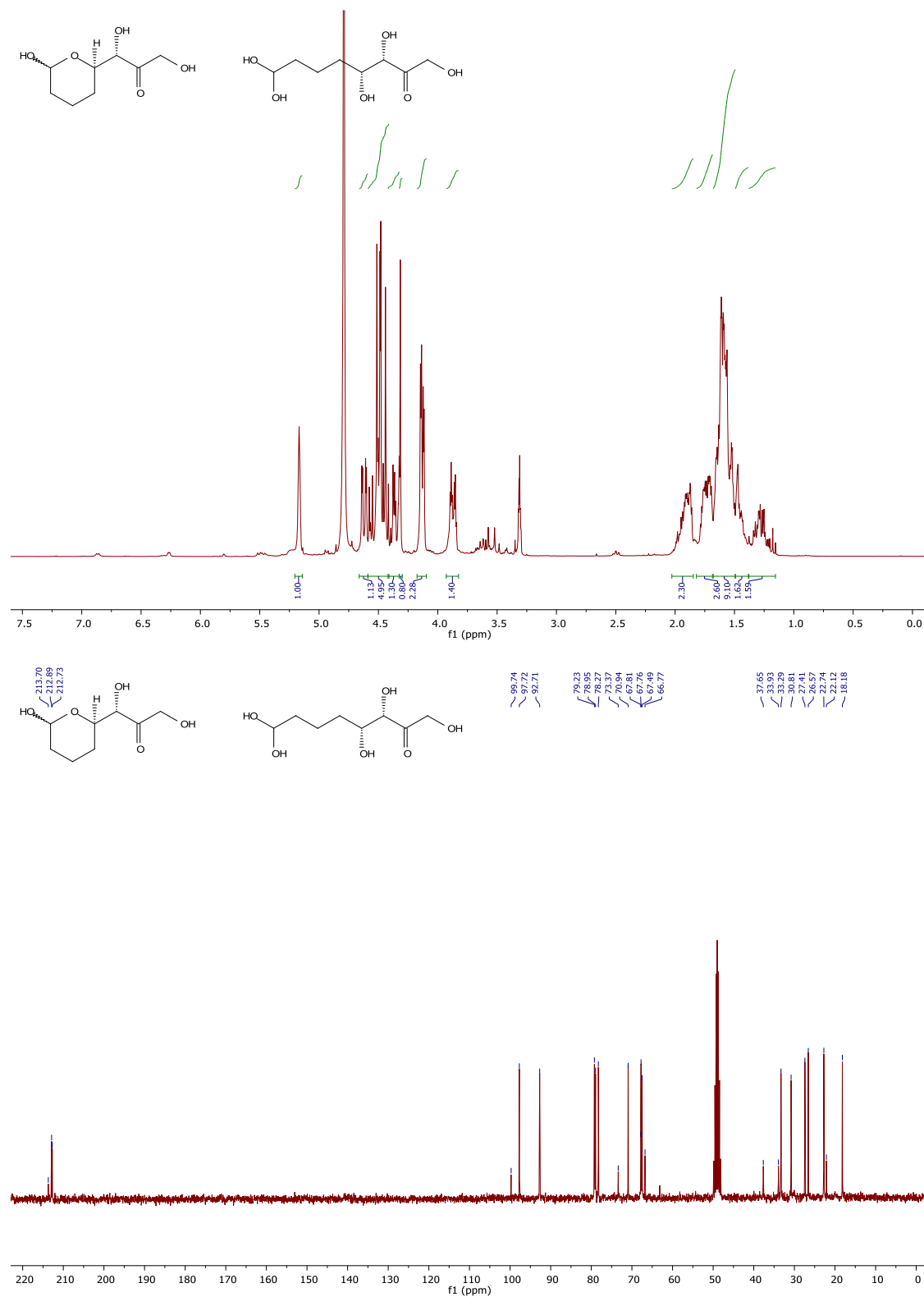


Abbildung 56. ^1H - (300.1 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, D_2O , unten) von 174.

Abbildung 57. ^1H - (300.1 MHz, Methanol- d_4 , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, Methanol- d_4 , unten) von 175 und 176.

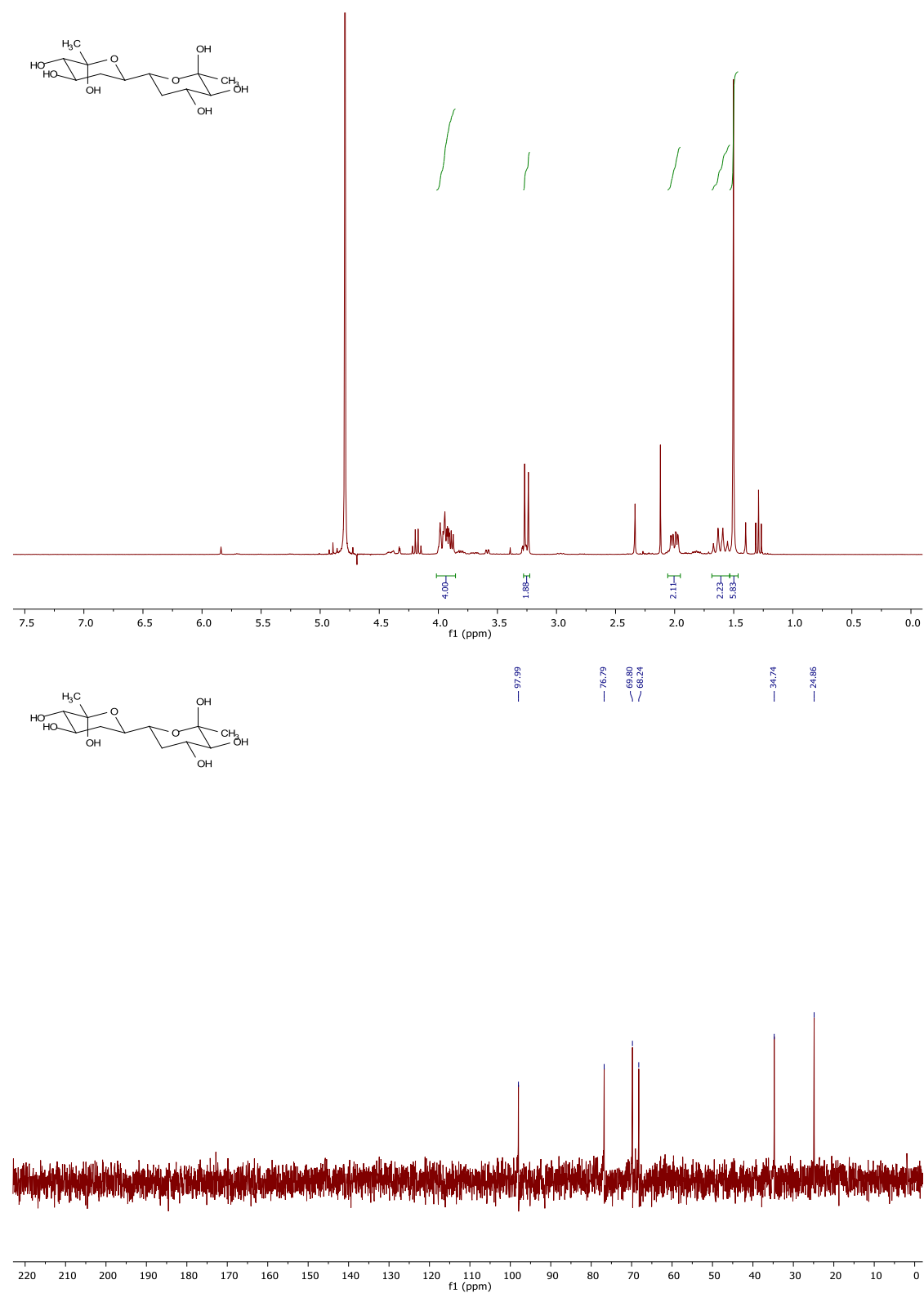
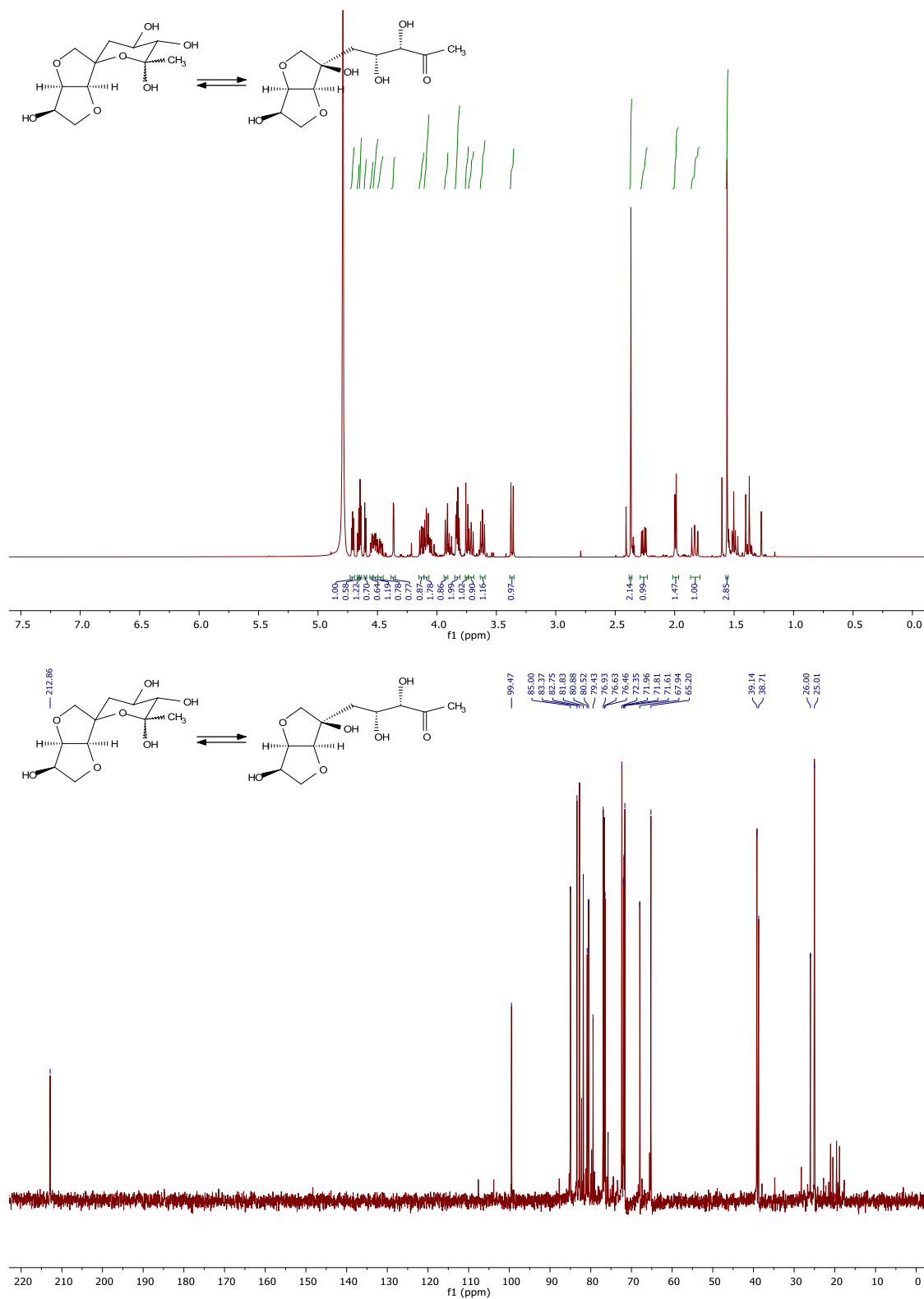


Abbildung 58. ^1H - (300.1 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, D_2O , unten) von 178.

Abbildung 59. ^1H - (300.1 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, D_2O , unten) von 188.

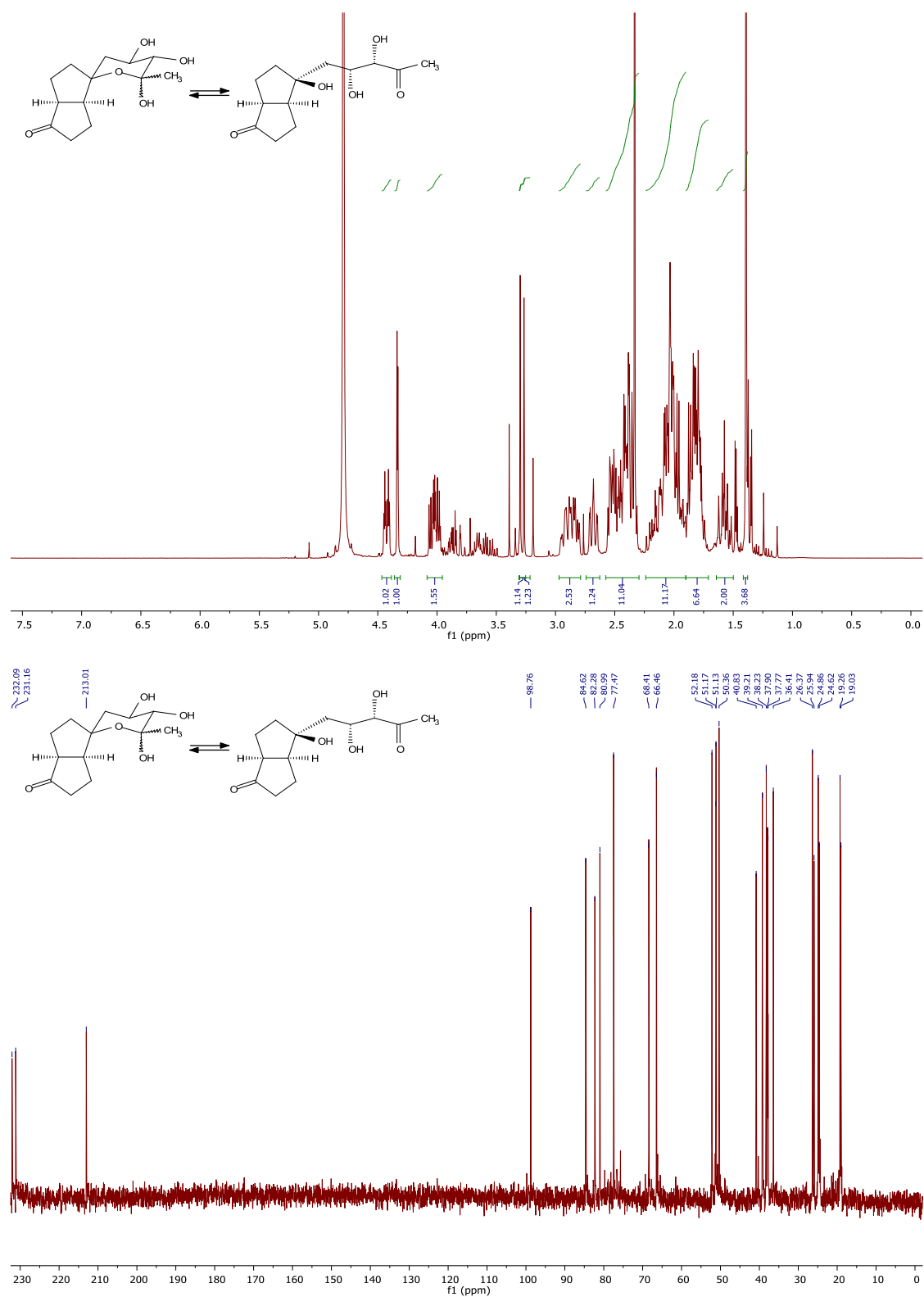


Abbildung 60. ¹H- (300.1 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, D₂O, unten) von 190.

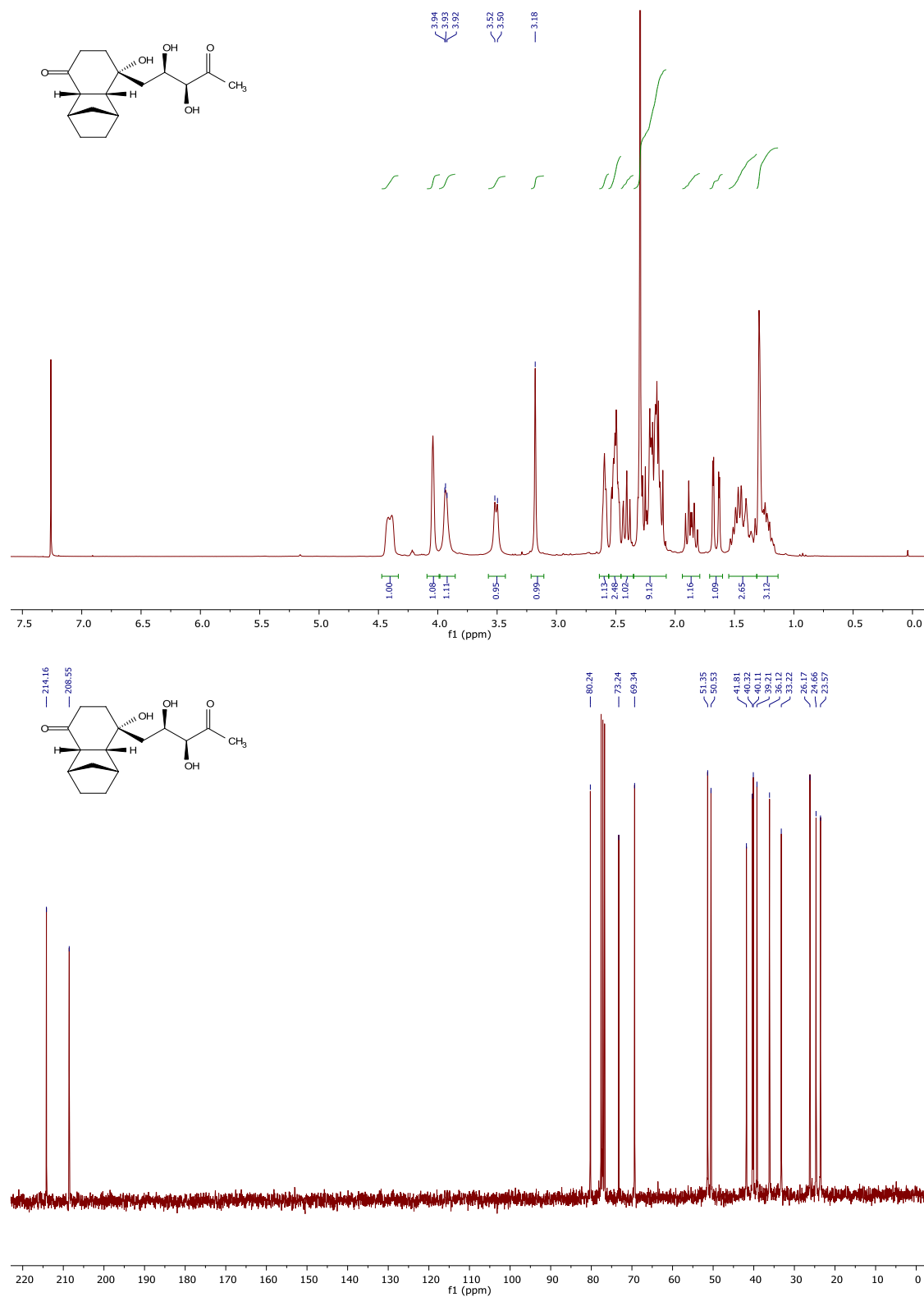
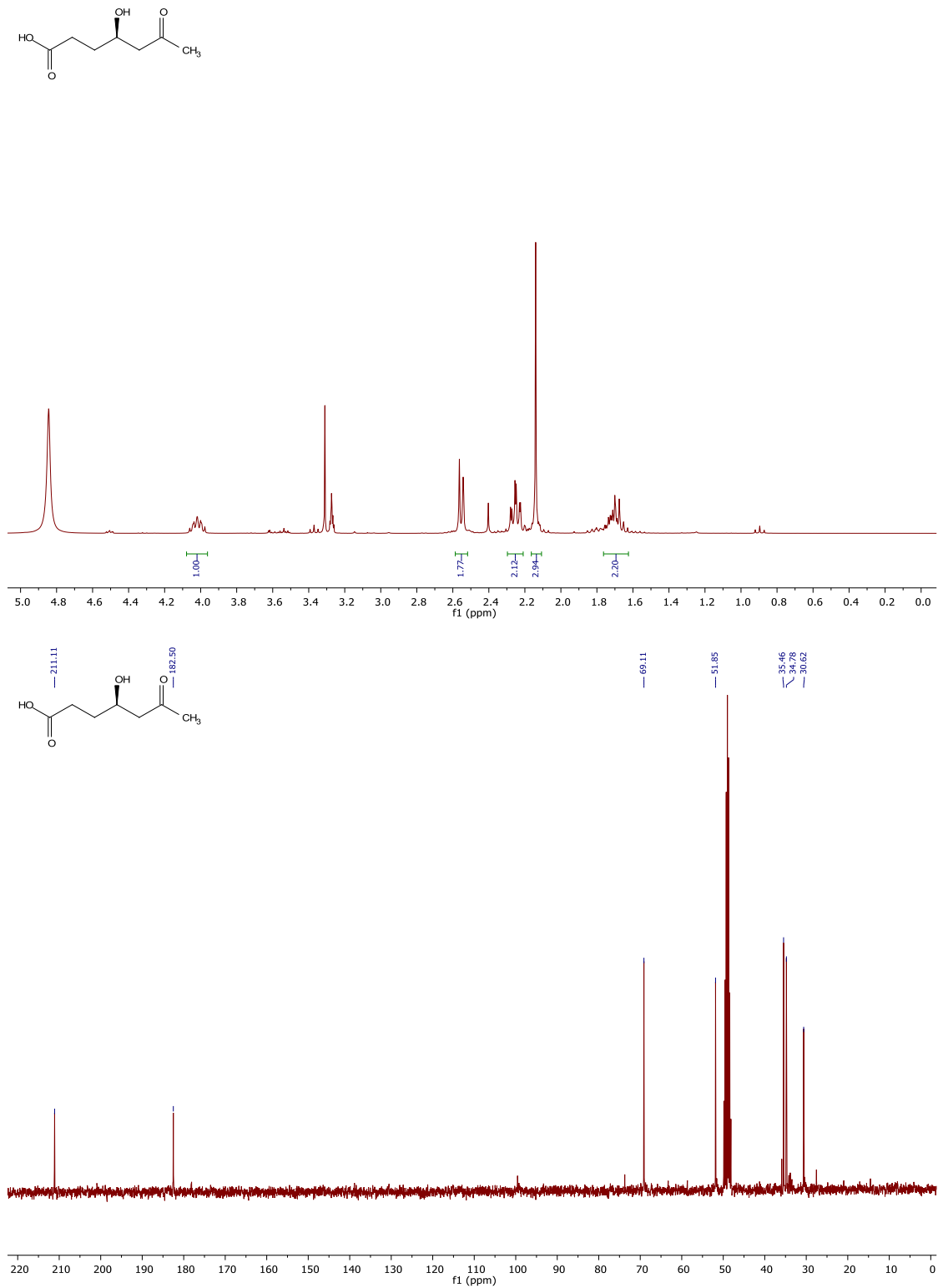


Abbildung 61. ¹H- (300.1 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (75.5 MHz, D₂O, unten) von 192.



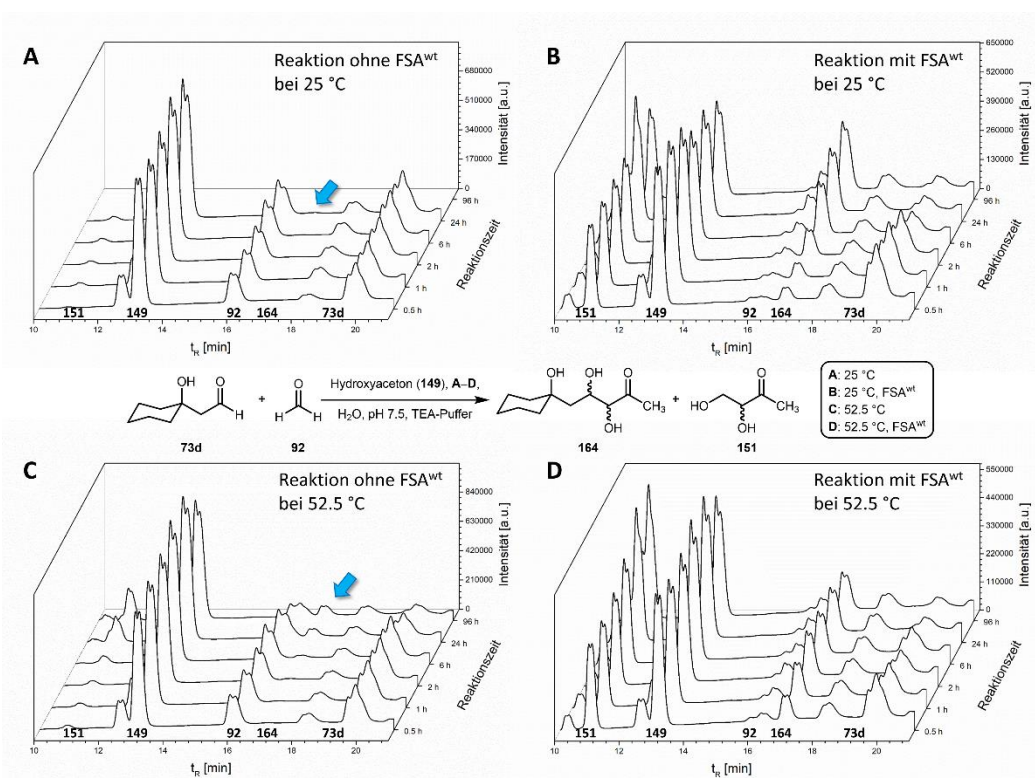


Abbildung 63. HPLC-Analyse des Temperaturscreenings von 2-(1-Hydroxycyclohexyl)acetaldehyd (73d) mit Hydroxyacetone (149). A) Reaktion ohne FSA^{wt} bei 25 °C (Messung bei 96 h), B) Reaktion mit FSA^{wt} bei 25 °C, C) Reaktion ohne FSA^{wt} bei 52.5 °C, D) Reaktion mit FSA^{wt} bei 52.5 °C. Blauer Pfeil: Nicht-enzymkatalysierte Bildung von Produkt 164.

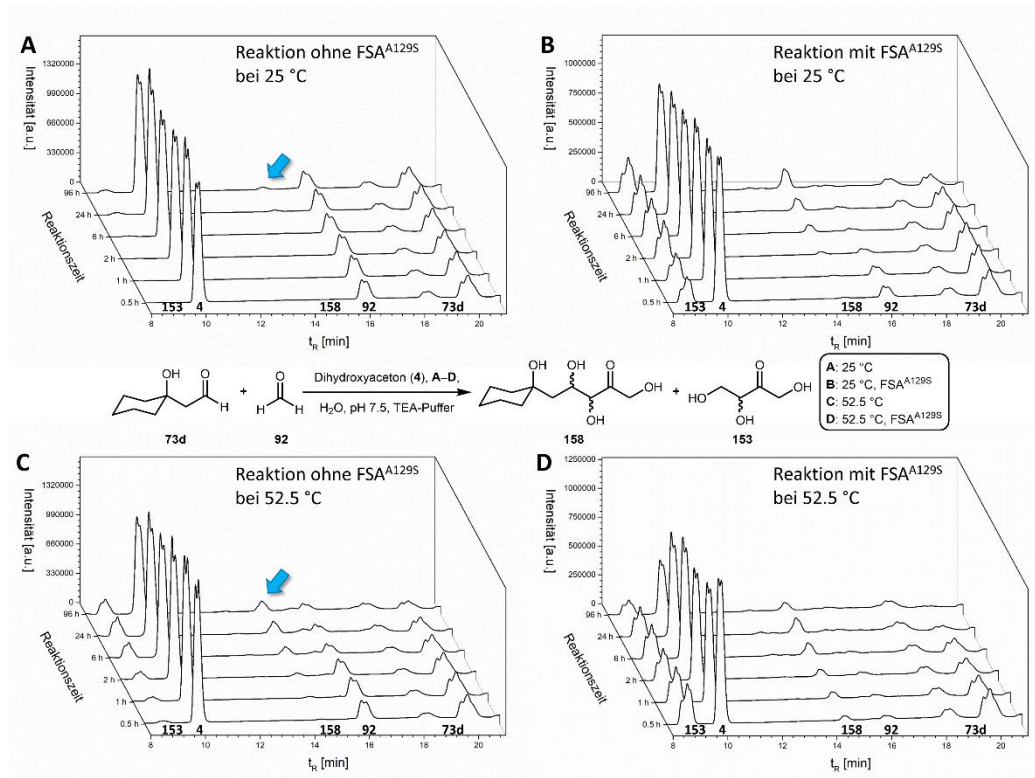


Abbildung 64. HPLC-Analyse des Temperaturscreenings von 2-(1-Hydroxycyclohexyl)acetaldehyd (73d) mit Dihydroxyacetone (4). A) Reaktion ohne FSA^{A129S} bei 25 °C, B) Reaktion mit FSA^{A129S} bei 25 °C, C) Reaktion ohne FSA^{A129S} bei 52.5 °C, D) Reaktion mit FSA^{A129S} bei 52.5 °C. Blauer Pfeil: Nicht-enzymkatalysierte Bildung von Produkt 158.

Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolf-Dieter Fessner für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Möglichkeit zur freien Gestaltung des Themas und den zahlreichen und hilfreichen Diskussionen. Wenn Bedarf zur Klärung von Problem- und Fragestellungen bestand hatte er stets ein offenes Ohr und immer wieder zahlreiche Ideen zur Lösung eben dieser.

Ohne Analytik lässt sich auch keine gute Organische Chemie praktizieren. Daher gilt mein Dank der NMR-Abteilung, besonders Herrn apl. Prof. Dr. Meusinger, Frau Spanheimer und Herrn Runzheimer, für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren und Hilfestellungen bei unüblichen Problemstellungen. Ebenso gilt mein Dank den Mitarbeitern der MS-Abteilung, Herrn Dr. Ing. Schießler, Frau Rudolph und Frau Sahinalp, für die Aufnahme der hochaufgelösten MS-Spektren und dem stets zügigen, reibungsfreien Service. Hans Michael Orfgen danke ich für die Unterweisung in den Arbeitskreis eigenen analytischen Messgeräten und der Lösung zahlreicher IT-relevanter Stolpersteinchen. Jede biochemisch arbeitende Gruppe benötigt auch einen guten Mit- und Zuarbeiter. Diesen verlässlichen Part übernahm Michael Kickstein. Ihm gilt mein Dank für die Unterweisung der Arbeiten im Biolabor und der Unterstützung bei biochemischen Aufgaben und der Bereitschaft zur Lösung biochemischer Fragen.

Den Kollegen mit denen ich die besondere Zeit im Labor 301 verbringen konnte (Ning He, Saravanan Thangavelu, Adel Muskotal, Tobias Glesner und Sjoerd Slagmann) danke ich für die hervorragende, ausgelassene Laboratmosphäre sowie die stetige Diskussionsbereitschaft und Hilfestellungen. Alexander Mertsch danke ich für die besonderen „Waldorf and Statler“-Momente, mit denen man sich auch schwierige Arbeitstage erträglich machen konnte. Besonderer Dank geht an Anna Szekrényi, die mir immer beratend und aufopferungsvoll bei Fragen und Problemen bezüglich DERA und FSA zur Seite stand. Den anderen Mitgliedern des Arbeitskreises gilt ebenfalls mein Dank für den ausgelassenen und dennoch wissenschaftlichen Umgang sowie der Lösung vieler theoretischer und praktischer Fragen. Serbet Pinar-Safi gilt mein Dank in Bezug für die Koordination zahlreicher verwaltungstechnischer Angelegenheiten und ihrer Funktion als „Gute Seele“ des Arbeitskreises.

Maria Knaub, Alexander Mertsch, Silvan Poschenrieder, Sandra Röhm und Alexander Santana danke ich für die schnelle Durchsicht dieser Arbeit. Sandra Röhm danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung der Bilder in *PyMOL*.

Und zu guter Letzt danke ich den zahlreichen Studenten aus dem Organisch-Chemischen Fortgeschrittenenpraktikum für das Herhalten als „Versuchskaninchen“ und der Ausdauer auch mit herausfordernden Aufgaben umzugehen. Max Briesenick, Tobias Glesner und Timothy Nowak danke ich für die praktische Unterstützung bei Teilen dieser Arbeit in Form von Vertiefungspraktika, wodurch diese Arbeit letztendlich ein ganzes Stück mehr Erkenntnisse erhalten hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Acke, Peter Fabian

Adresse: Rüsselsheimer Allee 86

 55130 Mainz

Geburtsdatum: 17.01.1987

Geburtsort: Hamburg

Familienstand: ledig

Bildungsweg

06/2020 Abgabe der Dissertation

10/2014 – 08/2019 Promotion an der Technische Universität Darmstadt (Praktischer Teil) im Fachbereich Organische Chemie unter Leitung von Prof. Dr. W.-D. Fessner. Thema: „*Entwicklung promiskuitiver Aldolasen*“

10/2007 – 03/2014 Diplomstudium Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Diplomarbeit im Fachbereich Organische Chemie unter Leitung von Prof. Dr. T. Opatz. Thema: „*Synthese von Tetraponerinen*“

08/1997 – 07/2006 Schulische Ausbildung (Gymnasium) an der Freiherr-vom-Stein-Schule in Frankfurt a. M.

Ort, Datum

Unterschrift

Erklärung gemäß §8(1) Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und nur mit den mir zulässigen Hilfsmitteln angefertigt habe. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder einer ähnlichen Fassung zu keinem früheren Zeitpunkt an einer in- oder ausländischen Hochschule eingereicht. Die schriftliche Version stimmt zudem mit der elektronischen Version überein.

Ort, Datum

Unterschrift

Erklärung gemäß §9 Promotionsordnung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle wörtlichen und paraphrasierten Zitate wurden angemessen kenntlich gemacht. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder einer ähnlichen Fassung zu keinem früheren Zeitpunkt an einer in- oder ausländischen Hochschule eingereicht.

Ort, Datum

Unterschrift